

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003 年 12 月 18 日 (18.12.2003)

PCT

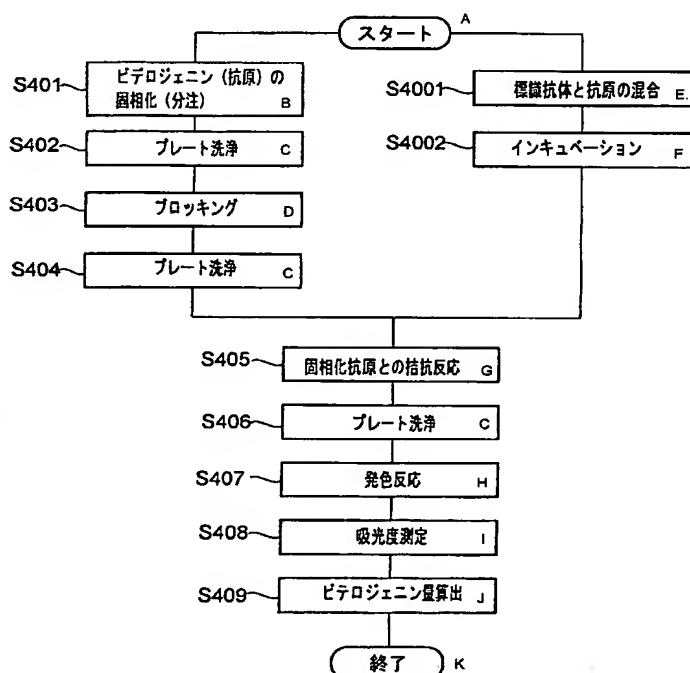
(10) 国際公開番号  
WO 03/104806 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: G01N 33/53, C07K 16/18 (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 東和科学株式会社 (TOWA KAGAKU CO., LTD.) [JP/JP]; 〒730-0841 広島県 広島市 中区 舟入町 6 番 5 号 Hiroshima (JP). 日本エンバイロケミカルズ株式会社 (JAPAN ENVIROCHEMICALS, LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府 大阪市 道修町二丁目 3 番 8 号 Osaka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/07296
- (22) 国際出願日: 2003 年 6 月 9 日 (09.06.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2002-167920 2002 年 6 月 7 日 (07.06.2002) JP
- (72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 河原 明 (KAWA-HARA, Akira) [JP/JP]; 〒739-2121 広島県 東広島市 高屋町小谷 2 7 5 1-1 1 2 Hiroshima (JP). 郷田 泰弘 (GODA, Yasuhiro) [JP/JP]; 〒532-0024 大阪府 大阪市 淀川区 十三本町二丁目 1 7 番 8 5 号 日本エンバイ

[続葉有]

(54) Title: DETECTION KIT, ASSAY PLATE TO BE USED THEREIN, DETECTION METHOD, EVALUATION METHOD, POLYCLONAL ANTIBODY OF FROG VITELLOGENIN AND PROCSS FOR PRODUCING THE SAME

(54) 発明の名称: 検出キット、それに用いられる測定プレート、検出方法、評価方法、カエルビテロジェニンのポリクローナル抗体及びその製造方法



A...START  
B...IMMOBILIZATION (PIPETTING) OF VITELLOGENIN (ANTIGEN)  
C...WASHING PLATE  
D...BLOCKING  
E...MIXING LABELED ANTIBODY WITH ANTIGEN  
F...INCUBATION  
G...ANTAGONISTIC REACTION WITH IMMOBILIZED ANTIGEN  
H...COLORATION REACTION  
I...MEASUREMENT OF ABSORBANCE  
J...CALCULATION OF THE AMOUNT OF VITELLOGENIN  
K...COMPLETION

(57) Abstract: A primary antibody recognizing vitellogenin is immobilized on the surface of a well preliminarily formed on a plate. Then a sample obtained from a subject exposed to an environment is injected into the well and reacted. Subsequently, a secondary antibody, which is labeled with an enzyme and recognizes the above vitellogenin, is injected and reacted. By injecting a color-development agent, a coloration reaction is carried out and the coloration level is measured. Based on the coloration level, the amount of the vitellogenin is calculated and thus the environment is evaluated based on the amount of the vitellogenin.

(57) 要約: 予めプレートに設けられた穴の表面にビテロジェニンを認識する 1 次抗体を固相化し、該穴に環境に曝露された検体から得られた試料を注入して反応させた後、酵素により標識され、前記ビテロジェニンを認識する 2 次抗体を注入して反応させ、次いで発色剤を注入することにより発色反応させて該発色量を測定し、その発色量からビテロジェニン量を算出し、該ビテロジェニン量に基づいて環境を評価する。



ロケミカルズ株式会社内 Osaka (JP). 三井 直子 (MIT-SUI, Naoko) [JP/JP]; 〒730-0841 広島県 広島市 中区舟入町 6 番 5 号 東和科学株式会社内 Hiroshima (JP).

(74) 代理人: 大森 純一 (OMORI, Junichi); 〒107-0062 東京都 港区 南青山 2-1 3-7 マトリス 4 F Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明 細 書

検出キット、それに用いられる測定プレート、検出方法、評価方法、  
カエルピテロジェニンのポリクローナル抗体及びその製造方法

## 技術分野

本発明は、例えばカエルピテロジェニンを使って環境を評価する技術の分野に属するものである。また、本発明は、特にカエルピテロジェニンの検出キット、測定プレート、ピテロジェニンの検出方法、評価方法及びカエルピテロジェニンのポリクローナル抗体に関する。

## 背景技術

近年、ヒトをはじめとする生体及び生態系に対する様々な化学物質の影響が問題となっている。

中でも、生体の内分泌系を攪乱し、その恒常性を阻害する「内分泌攪乱化学物質」、通称、環境ホルモンの影響が深刻化している。

内分泌攪乱化学物質（以下、環境ホルモンとも言う）は、本来生体が備えているホルモンと類似の作用、あるいはその作用の阻害等を引き起こし、それにより生体に対して異常をひき起こすと考えられている。内分泌攪乱化学物質の作用点として、例えば、ホルモンレセプターとの結合、ホルモン（リガンド）との結合、ホルモンの生体内での合成、ホルモンの代謝等の局面が指摘されているが、生体に対する内分泌攪乱化学物質の作用機序は多岐に亘ることから、現在までのところ、内分泌攪乱化学物質による内分泌攪乱作用のメカニズムについては明確に把握されていない。

ところで、内分泌攪乱化学物質の生体に対する影響は、専ら、形態異常や行動異常を指標として確認されてきた。しかしながら、形態異常や行動

異常を指標とした場合、これらは定量化が困難であり、かつ感度・精度も低いことから、化学物質の作用を形態異常や行動異常により見積もるのは危険が大きく、また困難である。そこで、形態異常や行動異常といった、生体の表現系に異常が生じる以前に、定量性をもって、化学物質あるいは環境の生体に対する作用を評価するための分子マーカーが求められている。

このような特性を備えた分子マーカーの一つとして、産卵性動物の卵黄蛋白前駆体であるピテロジェニンが注目されている。ピテロジェニンは通常雌個体の肝臓で繁殖期に活発に合成されるものであり、雄の血中にはピテロジェニンは通常検出されないか元々存在しない。このような特性から、ピテロジェニンは、高感度で、かつ定量性をもって化学物質あるいは環境の内分泌攪乱作用を評価できるマーカーとして注目されているのである。

このピテロジェニンを検出するため、例えば特開平2001-218582、特開平2001-122899、特開平2000-125867等ではコイ、メダカ等の魚類のピテロジェニン検出方法等についての記載があり、実際にこれらピテロジェニンの検出キットも実用化されている。

#### 発明の開示

しかしながら、化学物質の生態系全体に対する影響を把握し対処するためには、魚類のみならず、様々な栄養段階、系統進化段階に位置する生物について、化学物質の効果を正當に調査し評価しなくてはならない。

また、ピテロジェニンの構造は非常に複雑であり、また種によってかなり多様化しているため、特定の種に対して構成された既存の検査キットにより、他種に由来するピテロジェニンを測定することは非常に困難である。

本発明は、上記事情に鑑みてなされたものであり、両生類、特にカエルのピテロジェニンを定量性に優れ、かつ高感度に検出し、化学物質あるい



は環境評価を精度よく行うための技術を提供することを目的とする。

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、以下に示す手段により上記目的を達成した。

すなわち、本発明のカエルピテロジェニンの検出キットは、試料が注入される有底の穴を有するプレート本体と、前記穴の表面に固相化され、カエルピテロジェニンを認識する1次抗体とを有する測定プレートと、前記1次抗体が固相化された穴に注入される標準カエルピテロジェニンと、前記試料又は前記標品が注入された穴に注入され、前記カエルピテロジェニンを認識する2次抗体とを具備することを特徴とする。

また、別の観点によれば本発明の他の形態に係る検出キットは試料が注入される有底の穴を有するプレート本体と、前記穴の表面に固相化され、カエルピテロジェニンを認識する1次抗体と、前記1次抗体が固相化された穴に注入される標準カエルピテロジェニンと、前記試料又は前記標品が注入された穴に注入され、前記カエルピテロジェニンを認識する2次抗体とを具備することを特徴とする。

ここで、環境とは、環境中に存在する化学物質、又は該化学物質により汚染された環境を指す。

また、ここで言う試料とはカエルの血漿もしくは血清、組織及び細胞等である。本発明に用いることができるカエルの例としては、例えば、アカガエル (*Rana japonica*)、トノサマガエル (*Rana nigromaculata*)、ツチガエル (*Rana rugosa*)、ヒメアマガエル (*Microhyla ornata*)、スズガエル (*Bombina bombina*) 及びアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*)、(*Xenopus tropicalis*) 等を用いることができる。これらの中でも、アフリカツメガエルを用いた場合には、季節を問わず大量の卵ひいては成体を得ることができ個体の維持も容易

であることから好ましい。

本発明では、上記のような構成により、迅速且つ容易にカエルピテロジェニンを検出することが可能となる。

本発明では、特に、カエルピテロジェニンを認識する1次抗体がプレートの穴表面に固相化されているため、例えば後述する本発明の検出方法に係るサンドイッチ酵素免疫法でピテロジェニンを検出することが可能となる。

従来のピテロジェニン検出キットは、魚類のみを対象としたものであったが、本発明によればカエルを始めとする両生類のピテロジェニンを精度良く測定することができるので、これらの種における化学物質等の評価を正当に行うことが可能となる。

また、カエルは産卵性動物でもあり、発生過程における養分を担保するために卵内に大量の卵黄タンパク質を蓄積する。ピテロジェニンは、この卵黄タンパク質の前駆体であり、通常ならば雌個体の肝臓で合成されるものであり、雄には存在しない。しかしながら、エストロゲン等に曝露された雄個体の場合には、本来合成されることのないピテロジェニンの合成が肝臓で行われることから、該ピテロジェニンは、内分泌攪乱化学物質による内分泌攪乱作用メカニズムが不明であっても、環境における内分泌攪乱性を感度良く評価できるマーカーとして有効である。

また、カエルの生活環は水陸双方の環境に亘っているので、河川、湖沼、地下水などの水系若しくは周辺土壌の化学物質等に曝されるだけでなく、大気中の化学物質等にも曝されるという特徴がある。このため、野生生物に対する環境ホルモン等の化学物質の影響を評価する上で、カエルを利用する利点は大きい。

また、前記試料がカエルの血漿もしくは血清であることを特徴とする。本発明の検出キットに用いられる試料としては、野生若しくは環境に一

定期間曝露したカエル、あるいは実験室内で化学物質に曝露したカエル等の血漿もしくは血清又はある種の組織若しくは細胞に由来した試料を用いることができる。

これらを試料として用いることにより、検出精度を向上させることが可能となる。

また、プレートは、複数の穴を設けていることが好ましく、種々の公知のプレートを使用することができる。穴が複数あることにより様々な試料を同時に処理することができるので、処理効率が向上する。

また、穴表面に抗体が固相化されているため、試料を分注することで速やかに抗原抗体反応がおこり、迅速な処理を行うことができる。

また、前記2次抗体が、標識化合物により標識されていることを特徴とする。

ここで、標識化合物とは、例えばH R P（西洋ワサビペルオキシダーゼ）等の酵素や、ビオチン等をいう。

これにより、2次抗体あるいは2次抗体および2次抗体を認識する酵素標識検出体をプレート注入後発色剤と反応させることにより該標識酵素が発色し、この発色量を吸光度測定することによりピテロジェニン量を定量することができる。

前記1次抗体は、前記穴表面に吸着し固相化され、ブロッキング剤でブロッキングされていることを特徴とする。

これにより固相化された1次抗体は、確実に固定されるため、検出結果の信頼性も向上する。

また、本発明の別の形態に係る検出キットは、試料と、カエルピテロジェニンを認識し、標識化合物により標識された抗体が注入、混合される有底の穴を有する第1のプレートと、前記試料と抗体の混合液が注入される有底の穴を有する第2のプレート本体と、前記第2のプレートの穴の表面

に抗原として固相化された標準カエルピテロジェニンとを具備することを特徴とする。

このような構成によれば、酵素免疫法の中でも特に拮抗法に好適なキットとなり、この方法により効率良く処理を行い、適正な結果を得ることができる。

また、前記試料がカエルの血漿もしくは血清であることが好ましい。これにより効率良くピテロジェニンを検出することができる。

また、前記抗原は、前記穴表面に吸着し固相化され、ブロッキング剤でブロッキングされていることを特徴とする。

これにより非特異的抗体の結合が排除されているため、評価の信頼性も向上する。

本発明の測定プレートは、試料が注入される有底の穴を有するプレート本体と、前記穴の表面に固相化され、カエルピテロジェニンを認識する1次抗体とを具備することを特徴とする。

このような構成によれば、サンドイッチ法に係る検出キットの測定プレートとして用いることによりカエルピテロジェニンを効率良く検出することができる。

すなわち、プレート表面に予め抗体を固相化しているため、ここに試料を分注するだけで速やかに抗原抗体反応を得ることが可能となる。また、処理毎にプレートに抗体を固相化する必要もないので、結果のばらつきを防止することが可能となる。

また、本発明の別の形態に係る測定プレートは、試料とカエルピテロジェニンを認識し、標識化合物により標識された抗体との混合物が注入される有底の穴を有するプレート本体と、前記プレートの穴の表面に固相化された抗原としてのカエルピテロジェニンとを具備することを特徴とする。

このような構成によれば、この場合プレート表面には抗原を固相化して

いるため、拮抗法に係る検出キットの測定プレートとして用いることができ、それによりカエルピテロジェニンを効率良く検出することができる。

本発明の検出方法は、上述した検出キットを用いてカエルピテロジェニンを検出することを特徴とする。

このような構成によれば感度の良い検出キットを用いることができるので、検出の信頼性が向上する。

また、別の形態に係るカエルピテロジェニンの検出方法は、試料と、前記試料中に含まれるピテロジェニンを認識する抗体とを反応させる工程と、前記試料中に含まれるピテロジェニンと前記抗体の複合体に、標識化合物により標識され、前記ピテロジェニンを認識する2次抗体とを反応させる工程とを具備することを特徴とする。

このような構成によれば、酵素免疫法を用いてピテロジェニンを検出するので、検出精度も向上し、処理時間の短縮も可能となる。特に、本発明の検出方法は、サンドイッチ法に好適な方法であり、ピテロジェニンの検出感度を向上させることができる。

また、前記複合体と結合した2次抗体と発色剤とを反応させて、その発色反応に基づき前記検体中のピテロジェニン量を測定する工程を更に具備することを特徴とする。

これにより、サンドイッチ法により標識されたピテロジェニンを確実に定量することが可能となる。

また、本発明のカエルピテロジェニンの検出方法に係る別の形態としては、試料と、酵素により標識され前記試料中に含まれるピテロジェニンを認識する抗体とを反応させて複合体を得る工程と前記複合体とピテロジェニンとを拮抗反応させる工程とを具備することを特徴とする。

本形態に係る検出方法は、拮抗法であり、このような構成によりピテロジェニンの検出感度を試料の形態に応じて向上させることが可能となる。

また、前記拮抗反応により得られた反応生成物と発色剤とを反応させて、その発色反応に基づき前記検体中のピテロジェニン量を測定する工程を更に具備することを特徴とする。

これにより、拮抗反応により検出されたピテロジェニンを確実に定量することが可能となる。

このように、本発明の検出方法は、いわゆる酵素免疫法（E L I S A法）であり、サンドイッチ法、拮抗法いずれの方法であっても好適に行うことができる。

これにより、様々な試料を用いる場合でも、試料形態にあわせた感度の良い酵素免疫法を用いることが可能となる。

また、該検出方法で用いられる抗体は、ポリクローナル抗体であっても良く、モノクローナル抗体であっても良い。

また、前記試料がカエルの血漿もしくは血清であることが好ましい。これにより検出精度が向上する。

本発明の評価方法は、試料と、前記試料中に含まれるピテロジェニンを認識する抗体とを反応させる工程と、前記試料中に含まれるピテロジェニンと前記抗体の複合体に、標識化合物により標識され、前記ピテロジェニンを認識する2次抗体とを反応させる工程と、前記複合体と結合した2次抗体の標識酵素と発色剤とを反応させて、該発色量を測定する工程と、前記発色量からピテロジェニン量を算出し、該ピテロジェニン量に基づいて環境を評価する工程とを具備することを特徴とする。

このような構成によれば、サンドイッチ法に基づいて、的確な環境評価を行なうことが可能となる。

また、前記試料がカエルの血漿もしくは血清であることが好ましい。

また、本発明に係る別の形態の評価方法は、試料と、標識化合物により標識化され、前記試料中に含まれるピテロジェニンを認識する抗体とを反

応させて複合体を得る工程と、前記複合体とピテロジェニンとを拮抗反応させる工程と、前記拮抗反応により得られた反応生成物と発色剤とを反応させて、その発色反応に基づき前記検体中のピテロジェニン量を算出し、該ピテロジェニン量に基づいて環境を評価する工程とを具備することを特徴とする。

また、本形態においても、前記試料がカエルの血漿もしくは血清であることが好ましい。

このような構成によれば、拮抗法に基づいて、精度よく環境評価を行なうことができる。

また、上述したように、本発明の評価方法は酵素免疫法におけるサンドイッチ法又は拮抗法両方を適宜用いることができるため、様々な試料形態に対応して評価を行なうことが可能となる。

本発明のカエルピテロジェニンのポリクローナル抗体は、哺乳動物にカエルピテロジェニンを抗原として免疫し、前記免疫した哺乳動物から抗血清を採取し、前記抗血清から IgG として単離することにより得られることを特徴とする。

このようにして得られた抗体を用いることにより、特異的且つ高感度にカエルピテロジェニンを検出し、適切な環境評価を行うことが可能となる。

本発明のポリクローナル抗体の製造方法は、哺乳動物にカエルピテロジェニンを抗原として免疫して採取した抗血清から得られる IgG を、アフィニティカラムを用いて精製することにより得られることを特徴とする。

また、前記アフィニティカラムが雄カエル血清タンパク質と結合していることを特徴とする。

また、前記アフィニティカラムがカエルピテロジェニンと結合していることを特徴とする。

このような構成とすることにより、抗体そのものの結合特異性も向上す

るため、それにより検出、評価方法の精度も向上することができる。

本発明の別の形態に係る評価方法は、(両生類)に由来する肝細胞を培養する工程と、前記肝細胞に対し試料を投与する工程と、前記培養肝細胞の試料に対する応答を検出する工程とを具備することを特徴とする。

ここで、用いられる肝細胞は成体および幼生をはじめとする両生類のものを用いることができる。

また、評価試料とは、種々の化学物質や、例えば河川の水、工場廃水、下水処理場の処理水若しくは土壌の抽出成分等の環境試料をさす。

このような構成によれば、肝細胞を用いて、多数の試料に対して、経済的、迅速かつ簡便に、生体内のホルモン等に影響されず、肝細胞の応答が直接検定でき、厳密な曝露条件設定も可能となる。

本発明の別の形態に係る検出方法は、前記検出キットを用いてピテロジェニンを検出することを特徴とする。

ここで、応答とは、主にピテロジェニンの合成誘導を指すが、この他にもトランスフェリンやアルブミン等の誘導を指標とすることにより、他の環境ホルモンに属する化学物質の作用等を多面的に評価することが可能である。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、本発明の検出キット全体を示す模式図である。

図 2 は、本発明の検出キットの測定プレートの全体模式図である。

図 3 は、本発明の検出キットのサンドイッチ法に係る測定プレートの穴の部分断面図である。

図 4 は、本発明の検出キットの拮抗法に係る測定プレートの穴の部分断面図である。

図 5 は、本発明の検出方法における拮抗法を説明する工程図である。



図 6 は、本発明の検出方法におけるサンドイッチ法を説明する工程図である。

図 7 は、本発明のビテロジェニン抗体の特異性を示す画像である。

図 8 は、本発明の検出方法におけるビテロジェニンの検出感度を示すグラフである。

図 9 は、比較例のウェスタンブロッティングにおけるビテロジェニンの検出を示すグラフ及び画像である。

図 10 は、本発明の環境評価方法の水中曝露におけるビテロジェニンの合成誘導を示すグラフである。

図 11 は、本発明の環境評価方法の直接注入におけるビテロジェニンの合成誘導を示すグラフである。

図 12 は、培養肝細胞を使ったビテロジェニン合成誘導を示すグラフである。

図 13 は、アフィニティ精製ポリクローナル抗体の溶出方法の説明図である。

図 14 は、陰イオン交換クロマトグラフィーによる VTG の分離精製チャートパターン(上)およびフラクション溶液の SDS-PAGE/CBB 染色写真(下)である。

図 15 は、VTG 標準品の濃度定量例である。

図 16 は、VTG 標準品のゲル染色パターンを示す図である。

図 17 は、ELISA 法による VTG 標準品濃度を確認した結果を示す図である。

図 18 は、アフィニティ精製後の抗体価の上昇を示す図である。

図 19 は、免疫ロットの異なるアフィニティ精製ポリクローナル抗体間の抗体価の比較を示す図である。

図 20 は、抗体の特異性を示すであり、(a) は血清サンプルの CBB 染

色パターン、(b) はウェスタンブロッティングを示している。

図 2 1 は、固相化抗体濃度の条件の検討結果を示す図である。

図 2 2 は、HRP 標識抗体濃度の条件の検討結果を示す図である。

図 2 3 は、添加回収率実験および回収率改善のための BSA 添加検討を示す図であり、(a) は BSA なしの場合、(b) 0.5% BSA 添加の場合、(c) は 1% BSA 添加の場合、(d) 標準曲線をそれぞれ示している。

図 2 4 は、サンプル希釈液最適化後の希釈直線性を示す図である。

図 2 5 (a) は、カエルをティッシュペーパーで包んでいる様子を示す図である。

図 2 5 (b) は、針でカエルの脇腹を刺している様子を示す図である。

図 2 5 (c) は、カエルの脇腹から血液が玉状に出ている様子を示す図である。

図 2 5 (d) は、カエルから採血している様子を示す図である。

図 2 6 は、ELISA KIT 標準曲線を示す図である。

図 2 7 は、ELISA KIT 標準曲線における数値を示す図である。

図 2 8 は、ビオチン化抗体による ELISA 標準曲線を示す図である。

図 2 9 は、他種カエル VTG への交差反応性を示す図であり、(a) は ELISA の場合、(b) は SDS-PAGE/CBB 染色の場合をそれぞれ示している。

図 3 0 は、初代培養肝細胞における VTG 合成誘導を示す図である。

図 3 1 は、初代培養肝細胞における VTG 合成誘導の阻害効果を示す図である。

図 3 2 は、ピテロジェニン(VTG)標準曲線 (その 1) を示す図である。

図 3 3 は、ピテロジェニン回収率曲線 (その 1) を示す図である。

図 3 4 は、ピテロジェニン(VTG)標準曲線 (その 2) を示す図である。

図 3 5 は、ピテロジェニン希釈直線性 (その 2) を示す図である。

図 3 6 は、本発明の応用例に係るイムノクロマトの分解図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施の形態を図面に基づき説明する。

まず、検出キットについて説明する。この検出キットは酵素免疫法（E L I S A法）を用いてカエルピテロジェニンを精度良く検出するものであり、E L I S A法の中でもサンドイッチ法及び拮抗法のどちらに対しても対応できるようになっている。

まず、サンドイッチE L I S A法を用いてカエルピテロジェニンを検出する検出キットを図に基づいて説明する。図1は本実施形態に係るピテロジェニンの検出キット1全体の構成を模式的に示す図である。

ここで、検出キット1の構成としては、試料が注入されるピテロジェニンを認識する1次抗体12を固相化してある有底の穴101を有するプレート10と、標品としての参照用カエルピテロジェニン11と、酵素やビオチン等により標識された2次抗体13とが含まれている。

また、これらの他に、試料を希釈する検体希釈液14、抗体を希釈する抗体希釈液15、2次抗体13の標識の発色反応を行うための基質溶液と発色剤16、処理中の液を安定させるための緩衝液17、過剰反応を抑制する反応停止液18あるいは所定時にプレートを洗浄するための洗浄液19等、通常のE L I S A法に用いられる試薬等が含まれている。

検出キット1ではこのような構成により、プレート10の穴101に、環境に曝露されたカエルから採取した試料を注入し、試料に含まれているピテロジェニンと、標品11、1次抗体12及び2次抗体13との抗原抗体反応を行い、それをE L I S A法に基づいて検出することにより、感度良くピテロジェニンを検出することができる。

ここで、検出キット1に用いられる試料としては、野生若しくは環境に一定期間曝露したカエル、あるいは実験室内で化学物質に曝露したカエル

等の体液又は組織若しくは細胞に由来した試料を用いることができる。好ましくは、後述するようにカエルの血漿、肝臓のホモジネート、初代培養肝細胞が良い。ピテロジェニン<sup>®</sup>は、肝臓で合成され、血液にて運ばれるため、これらを試料とすることにより、精度よくピテロジェニンの検出を行うことができる。

また、前記試料がカエルの血漿もしくは血清であることが好ましい。また、培養肝細胞であることが好ましい。

組織の場合は肝臓ホモジネートであることが好ましく、また細胞の場合には初代培養肝細胞であることが好ましい。

これにより、カエル体内のピテロジェニンの検出感度を向上させることが可能となる。

また、これら試料、1次抗体、2次抗体及び標品ピテロジェニンは、上述した緩衝液で希釈して処理を行うようになっている。

また、2次抗体の標識としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)やビオチン等が好ましいが、その他従来公知の標識を種々用いることができる。

図2は本実施形態に係る検出キット1のプレート10の模式図である。

図2に示すように、この検出キットのプレート10には、試料を注入するための穴101が複数設けられている。ここでは例えば1列当り8個の穴を設けたプレートが12個つながることにより96穴設けられており、この穴101内で一連の処理が行われるようになっている。この穴の部分断面図を図3に示す。

穴101の表面は、ここでは後述する検出方法のうちサンドイッチ法を用いることにより、予め抗体を固相化するようになっている。図3では例として1次抗体111が固相化されている状態を示している。

次に拮抗法に用いられる検出キットの構成について概要を説明する。キ

ットとして用いられる試薬等はほぼサンドイッチ法と同じであるが、図 4 に示すように、拮抗法では、プレート 20 の穴 201 には抗原としてカエルピテロジェニン 211 が固相化されており、さらに別のプレート（図示せず）で、予め試料と標識された抗体とを混合させておき、この混合物をプレート 20 に注入し、その反応を測定することによりピテロジェニンを検出できるようになっている。

このように、本実施形態に係る検出キットを用いることにより、試料中に含まれるピテロジェニンの量が低濃度であっても、高感度に検出することが可能となり、それにより緻密な環境評価を行うことが可能となる。また、予め抗原若しくは抗体を固相化しておくことにより、利便性も向上し、処理も迅速化することができ、更には得られる結果の信頼性も向上させることができる。

従来のピテロジェニンを検出するためのキットはメダカやコイ等魚類のピテロジェニンの検出に限られており、魚類以上の体制を有する高等生物に対応できなかったが、この検出キットによれば、カエルという両生類のピテロジェニンを検出することが可能となり、網羅的に環境を評価することができる。

次に、カエルピテロジェニンの検出方法について説明する。

本実施形態に係る検出方法は、上述した検出キットを用いて行うものであり、酵素免疫法、すなわち E L I S A 法に基づきピテロジェニンを検出する方法である。

ここで、E L I S A 法ではサンドイッチ法及び拮抗法という 2 つの方法が知られているが、この検出方法ではそのどちらの方法にも対応している。

以下、各方法における工程を図に基づき説明する。図 4 は拮抗法による検出方法の工程を説明する工程図である。図 5 はサンドイッチ法による検出方法の工程を説明する工程図である。

### 拮抗法

まず、固相抗原として標品の固相化を行う。標品ピテロジェニンを希釈してマイクロプレートに分注して、インキュベーションし（ステップ401）固相化を行う。所定時間経過した後にプレートを洗浄し（ステップ402）、ブロッキング剤を分注してプレート穴表面のブロッキングを行う（ステップ403）。その後余分な薬剤を除去するためプレート洗浄を行う（ステップ404）。

この固相化を行っている時に平行して、別のプレートでHRP標識抗体と環境に曝露した検体試料（若しくは抗原）を混合し（ステップ4001）、インキュベーションする（ステップ4002）。このようにして得られた抗原抗体複合体を固相化抗原プレートに分注して拮抗反応させる（ステップ405）。次いでプレートを洗浄し（ステップ406）、その後発色基質を注入して発色反応させる（ステップ407）。反応が終わるとマイクロリーダー等で吸光度を測定し（ステップ408）、その値からピテロジェニン量を算出する（ステップ409）。

### サンドイッチ法

マイクロプレートの各穴に1次抗体の希釈液を分注し、所定時間インキュベーションする（ステップ501）。その後プレートを洗浄し（ステップ502）、ブロッキング剤を分注して固相化する（ステップ503）、次いで、環境に曝露した検体試料若しくは標品ピテロジェニン（希釈液）を分注して、反応する（ステップ504）。その後、プレートを洗浄し（ステップ505）、次いで2次抗体を分注、反応させる（ステップ506）。次いでプレートを洗浄し（ステップ507）、その後発色基質を分注して発色反応させる（ステップ508）。発色反応後、マイクロリーダー等により吸光度を測定し（ステップ509）、その結果に基づきピテロジェニン量を算出する（ステップ510）。

上述したように、この検出方法では2通りの検出方法を用いることが可能であり、様々な検体を用いることができる。また、これにより検出感度も向上させることができる。

次に、環境評価方法について説明する。

本実施形態に係る環境評価方法は、上述した検出キットと検出方法を用いることにより、従来検出できなかったカエルピテロジェニンを用いることを可能として環境中の環境ホルモン等内分泌攪乱性化学物質及び種々の化学物質の影響を評価するものである。

現在実用化されているピテロジェニン検出キットとしてはメダカやコイ等の魚類に対応したものしかなく、魚類以外の生物を含めた網羅的な環境評価ができないという不具合があったが、本発明の環境評価方法ではカエルを用いているため、カエルから検出されるピテロジェニン量に基づいて、網羅的に環境を評価できるという利点がある。

ここで、検体として用いるカエルを環境に曝露する方法としては、飼育水への対象物質の添加や、各個体への直接注入等の方法が用いられる。また、野生に存在しているカエルを採取して、そこから試料を得ることにより、容易且つ高精度に自然環境そのものを評価できるので、様々な環境に対する評価が可能となる。

本実施形態に係る環境評価方法では、このようにして得られた検体及び対照区で飼育した検体のそれぞれから試料を作製し、検体中のピテロジェニン量を測定、対照区と比較することで対象物質の内分泌攪乱作用や化学物質の毒性を判断することができる。すなわち、評価対象となる化学物質（例えばビスフェノールA、フタル酸エステル等）の存在下で雄のカエルを飼育し、経時的に血漿中のピテロジェニン量を測定し、対照区のカエルから得られた血清中のピテロジェニン量と比較する。その結果、実験区の両生類から得られたピテロジェニン量が対照区の量と比較して高い場合

は、評価対象となる化学物質が内分泌攪乱作用を有すると判断される。あるいは、雄のカエルを、基準となるエストロジェンと評価対象となる化学物質との共存下で飼育した後、血液などを採取し、試料中に含まれるビテロジェニンを本発明の抗体と反応させてビテロジェニン量を測定し、得られた測定値の大小により、化学物質の毒性（例えば内分泌攪乱作用）を評価することができる。すなわち、評価対象となる化学物質の存在したで雄のカエルを飼育し、経時的に血清中のビテロジェニン量を測定し、対照区のカエルから得られた血清中のビテロジェニン量と比較する。その結果、実験区のカエルから得られたビテロジェニン量が対照区の量と比較して低い場合、評価対象となる化学物質は、内分泌攪乱作用を有すると判断される。

また、ある濃度のエストロジェン存在下で飼育したときのビテロジェニン濃度と、評価対象となる化学物質存在下で飼育したときのビテロジェニン濃度とを比較することにより、評価対象となる化学物質の内分泌攪乱作用の強度をエストロジェンと相対化して評価することが可能である。すなわち、ある濃度（例えば 1.0 ppm）のエストロジェン存在下で飼育したときのビテロジェニン量が、内分泌攪乱作用の強度が不明であって、ある濃度（例えば 0.1 ppm）の化学物質の存在下で飼育したときのビテロジェニン量と同じである場合は、当該化学物質の内分泌攪乱作用はエストロジェンに対して 10 倍強いと判断することができる。

また、当該評価方法によれば、評価対象となる河川や湖沼等に生息する雄のカエルの体液中のビテロジェニン量を測定することにより、内分泌攪乱作用を有する化学物質による環境の汚染状態を評価することも可能である。

次にカエルビテロジェニンのポリクローナル抗体について説明する。

上記カエルビテロジェニンのポリクローナル抗体は、従来公知の様々な



方法のいずれかによって製造することができる（例えば Sambrook, J et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) を参照）が、以下に示すポリクローナル抗体の製造方法により製造された抗体が好ましい。以下、その製造方法に基づきこのポリクローナル抗体の説明をして行く。

哺乳動物、例えばラット、マウス、ウサギ等にカエルピテロジェニンを抗原として投与し、免疫する。抗原の動物 1 匹当りの投与量は、例えばアジュバントを用いるときは 500～1000  $\mu$ g である。アジュバントとしてはフロイント完全アジュバント (FCA)、フロイント不完全アジュバント (FIA)、水酸化アルミニウムアジュバント等があげられる。免疫は、主として皮下注入することにより行われる。また、免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔、好ましくは初回免疫から 3 週間後に、2 週間間隔で 1～2 回免疫を行う。そして、最終免疫日から 5～20 日後、好ましくは 7～14 日後に抗血清を採取する。次いで、得られた抗血清から硫酸分画法および DEAE-セファデックスカラムクロマトグラフィーにより IgG を得る。

ここで、ピテロジェニン特異抗体を得るためにはカエル血清タンパク質と結合した吸着カラムを用いて吸着精製させ、更にカエルピテロジェニンと結合したカラムを用いてアフィニティ精製することが望ましい。

このように、単に抗血清より IgG を単離するだけでなく、アフィニティ精製することにより、ポリクローナル抗体の特異性と感度向上が可能となる。

本実施形態に係るピテロジェニンの製造方法では、カエル体内でピテロジェニンの合成誘導を行い、前記カエルから血液を採取して上清を採取し、前記上清を分離精製するようになっている。ここで、上清の分離精製方法

としては、遠心分離や、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー等を適宜組み合わせることにより、効率良く、且つ精度良くピテロジェニンを製造することができる。

#### (実施例)

以下、実施例を用いて本発明を詳細に説明する。ただし、本発明がこれに限定されないことは言うまでもない。

#### <実施例 1. アフリカツメガエルを用いたピテロジェニンアッセイ法>

(1) 装置：タンパク精製システム、マイクロプレートリーダー（東ソー社製）

(2) 材料：アフリカツメガエル雄成体

17 $\beta$ -エストラジオール：CAS No.: 50-28-2、分子式、  
分子量：272.4

Lot No.: 19C-0519（入手先：SIGMA）

抗ピテロジェニンウサギ抗血清：1979年に作成され-80℃保存していたものを用いた

#### (3) ピテロジェニン抗原の製造例

ピテロジェニンタンパク質を得るために、アフリカツメガエル成体雄に 10mg/ml 17 $\beta$ -エストラジオール（以下E2ともいう）を含むプロピレングリコール溶液を 30 $\mu$ g/g BW(Body Weight) の濃度で注射し、ピテロジェニンの合成誘導をおこなった。8日間の飼育後に採取した血液を凝固させ、4℃、15000rpmで5分間遠心し、上清（血清）を採取した。この血清サンプル1mlずつを陰イオン交換クロマトグラフィーシステム（QAE-Sephadex、Bio-Radエコノシステム）で分離精製し、ピテロジェニン標品を得た。BSA（牛血清アルブミン）を標準タンパク質としてBCA試薬により定量し、0.5mg/mlの50%グリセロールPBS溶液として、-20℃で保存し

た。これを以下の実験の標準ピテロジェニン溶液として用いた。

#### (4) ピテロジェニン抗体の製造例

−80℃凍結保存の抗ピテロジェニンウサギ抗血清10mlから、硫酸分画によりIgG抗体を回収した。ピテロジェニンに対する抗体の純化のため、回収したIgG抗体液を、アフリカツメガエル正常雄血清を結合させたSephacrose 4B吸着カラムで精製した。また、精製したピテロジェニン結合Sephacrose 4Bカラムによってアフィニティ精製を行った。標識抗体作製のため、精製抗体に過ヨウ素酸酸化法により西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)を共有結合させた(HRP標識ポリクローナル抗体)。

以上のようにして、吸収精製ポリクローナル抗体およびアフィニティ精製HRP標識ポリクローナル抗体の2種類を、以下の実験の抗体溶液として用いた。

#### (5) ウェスタンブロッティングによるピテロジェニン検出法(比較例)

SDS-7.5%アクリルアミドゲルを作成し、上述したようにE2を注射により投与したアフリカツメガエル成体雄血清および正常雄血清をそれぞれ0.05μlと、精製ピテロジェニン抗原7.5-750ng範囲の希釈系列を電気泳動し、ゲル中の分離タンパク質をセミドライ法によりメンブレンにブロッティングした。ピテロジェニンポリクローナル抗体1μg/mlで免疫反応を行ったのち、HRP標識抗ウサギIgGヤギ抗体と反応させ、化学蛍光発色法によりピテロジェニンをX線フィルム上で検出した。これにより、抗体の特異性およびウェスタンブロッティングによる検出感度を検証した。

#### (6) ELISAによるピテロジェニン検出法

ELISAによるピテロジェニンの検出はa) サンドイッチ法、b) 拮抗法の2種類で行い、精製したピテロジェニン標品の希釈系列を用いて検

出感度を比較検討した。

それぞれの検出手順は、予備実験ののち下記の通りに設定した。

#### 実施例 1 a : 拮抗法

##### 1. ビテロジェニン抗原の固相化

PBSで希釈した  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  の標準ビテロジェニンを  $50 \mu\text{l}$  ずつマイクロプレートに分注し  $37^\circ\text{C}$  で2時間インキュベートする

1. プレート洗浄 ( $0.1\%$  Tween 20-PBS)

2. プレートのブロッキング ( $0.5\%$  I-Block、 $0.1\%$  Tween 20-PBS)

3. HRP標識ポリクローナル抗体に対する抗原の拮抗反応

別のプレート上で、抗原  $30 \mu\text{l}$  と  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  HRP標識ポリクローナル抗体  $30 \mu\text{l}$  (ブロッキング液希釈) を混合し、1時間室温でインキュベートする

4. 固相化プレートの洗浄 ( $0.1\%$  Tween 20-PBS)

5. 固相化抗原への抗体結合反応

4. の混合液  $50 \mu\text{l}$  を固相化プレートに移し、1時間室温でインキュベートする

6. プレート洗浄 ( $0.1\%$  Tween 20-PBS)

7. 発色基質ABTSを用いたペルオキシダーゼ反応

8. プレートリーダーによる  $405 \text{ nm}$  の吸光度測定

#### 実施例 1 b : サンドイッチ法

##### 1. ビテロジェニン抗体の固相化

PBSで希釈した  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  の抗ビテロジェニン抗体を  $50 \mu\text{l}$  ずつマイクロプレートに分注し  $4^\circ\text{C}$  で一晩インキュベートする

2. プレート洗浄 ( $0.1\%$  Tween 20-PBS)

3. プレートのブロッキング ( $0.5\%$  I-Block、 $0.1\%$  T

w e e n 20-PBS)

検体あるいは標準抗原と固相化抗体の反応：室温2時間、抗原はブロッキング液で希釈する。

4. プレート洗浄 (0.1% Tween 20-PBS)

5. HRP標識ビテロジェニンポリクローナル抗体との反応

ブロッキング液で希釈した  $2 \mu\text{g}/\text{ml}$  の HRP 標識抗ビテロジェニン抗体を  $50 \mu\text{l}$  加え、室温1時間インキュベートする。

6. プレート洗浄 (0.1% Tween 20-PBS)

7. 発色基質 ABTS を用いたペルオキシダーゼ反応

8. プレートリーダーによる  $405 \text{ nm}$  の吸光度測定

#### (8) 実験結果

##### ○ポリクローナル抗体の特異性

E2 を注射したアフリカツメガエル成体雄の血清、および正常成体雄の血清を用いてウェスタンブロッティングを行い、本抗体による免疫染色を行った。精製前の抗体を用いると、それぞれの血清に共通するタンパク質が検出された(図6-A)。一回の吸収カラム精製により抗体のビテロジェニンに対する特異性が高まり、正常成体雄の血清タンパク質とは免疫反応を示さなくなった(図6-B)。

##### ○ELISAの検出感度

本抗体を用いたビテロジェニン検出方法において、ELISA拮抗法、ELISAサンドイッチ法、ウェスタンブロット法の3つについて、現在用いている条件設定での検出感度を比較した。

ELISAによる二つの方法について、標準ビテロジェニン濃度を  $0.1 \sim 4000 \text{ ng}/\text{ml}$  の範囲で設定し、検出感度を検証したところ、拮抗法では最低検出限界(3SD)が  $20 \text{ ng}/\text{ml}$  程度(図7-A)であったのに対し、サンドイッチ法では最低検出限界(3SD)が  $3 \text{ ng}/\text{ml}$  程

度(図7-B)となり、低濃度側のピテロジェニンを検出するためにはサンドイッチ法がより検出感度が高いことを示す結果となった。ただし、直線性を示す定量限界は $30 \text{ ng/ml}$ 程度であった。

また、比較例としてピテロジェニン量を $7.5 - 750 \text{ ng}$ の範囲に設定し、ウェスタンブロッティングにより検出した結果、 $10 \text{ ng}$ 程度で検出可能であった(図8)。

#### (8) 考察

環境物質のピテロジェニン合成への影響評価を行うには、雄成体内で合成されたピテロジェニンをできるだけ低濃度で検出できる測定法が必要であると考えられる。そのため以下の検討を行った。

凍結保存されていた抗血清を、正常雄血清タンパク質結合カラムで吸収操作を施すことにより、ピテロジェニンに対する特異性が格段に上昇した。特異性をあげることは、低濃度のピテロジェニン検出に有効であると考えられる。

2種のELISA検出方法による感度の違いを抗原の最低検出濃度で比較した。ELISA拮抗法では $20 \text{ ng/ml}$ 程度であったのに対し、ELISAサンドイッチ法では $3 \text{ ng/ml}$ 程度であった。拮抗法では、低濃度側での測定値のばらつきが大きく、サンドイッチ法では少ないので、サンドイッチ法がより低濃度抗原の検出に有効であった。また、抗体の固相化を十分に行うことにより抗原と抗体との衝突頻度を高めることが好感度化には有効であると考えられ、プレートに薬品処理を施す等抗体の固相化効率を上げることが有効であると思われる。

また、比較例としてウェスタンブロッティングの検出感度を検討した。その結果、約 $10 \text{ ng}$ 以上で定量的に検出された。ウェスタンブロッティングはELISA法より検出感度が低い傾向があり、操作が煩雑で検出に時間がかかるが、抗原を定性的に確認することができるという利点がある。

ピテロジェニン<sup>1</sup>は分解されやすく、同法では分解産物を検出できない可能性もあり、ELISAとウェスタンブロッティングの両方法を組み合わせることで、ピテロジェニン合成への環境物質の影響を正しく評価することができると考えられる。

## <実施例 2. アフリカツメガエルピテロジェニンアッセイ>

### 実施例 2 - 1 : 曝露試験方法の比較

曝露試験は飼育水への E 2 の添加および、個体への E 2 の注入の 2 種類の方法で行い比較検討した。

#### 1) 材料と曝露方法

##### A. 水中曝露方法

同一年齢（二歳半）の成熟雄アフリカツメガエルを用い、20 L の脱塩素水道水に DMSO に溶かした E 2 を添加したもの（実験群）および脱塩素水道水に溶媒である DMSO を同量添加したもの（対照群）を充填したガラス水槽内で 5 匹ずつ飼育することにより実施した。E 2 の曝露濃度は 0.1 nM、1 nM、10 nM、100 nM、1000 nM の 5 段階で実施し、7 日間の飼育の間、3.5 日目に 1 回飼育水の交換を行った。水温は 22℃、明暗期ともに 12 時間に設定するとともに、試験期間内は給餌を行わなかった。

##### B. 注射法

A と同一年齢の成熟雄アフリカツメガエルを用い、E 2 溶液を注射により注入したもの（実験群）および溶媒としたプロピレングリコールを約 200  $\mu$ l 注射により注入したもの（対照群）を 20 L の脱塩素水道水を充填したガラス水槽内で 5 匹ずつ飼育することにより実施した。E 2 の曝露濃度は 0.002  $\mu$ g/g BW、0.02  $\mu$ g/g BW、0.2  $\mu$ g/g BW、2  $\mu$ g/g BW、20  $\mu$ g/g BW の 5 段階で実施し、7 日間の飼育の間に 1 回（3.5 日目）再注入を行った。水温は

22℃、明暗期ともに12時間に設定するとともに、試験期間内は給餌を行わなかった。

なお、注射に際しては各個体について体重を測定し、設定濃度になるように200μl前後のE2溶液を注射した。

## 2) 検体採取方法

ピテロジェニンの検出は、血漿試料および肝臓ホモジネート試料の2種類の試料を用いて行い、比較検討した。

### A. 血漿の採取

1. カエル腹腔へ麻酔薬 (20mg/ml aminobenzoic acid ethyl ester) を0.5~1.0ml注射する
2. 開腹し、拍動する心臓から注射器で血液を0.2ml、チューブに採取し氷上に置く
3. 15000rpm、10分、4℃で遠心し、上清の血漿を採る
4. 20mM EDTA-0.2% Tween 20-PBS溶液で10倍希釈して冷蔵保存 (長期保存の場合は冷凍保存)

希釈試料はELISAサンドイッチ法でピテロジェニンを定量した

### B. 肝臓ホモジネートの採取

1. 上記採血後に肝臓片を0.05~0.1g程度切り取り、重さを測る
2. 肝臓片を入れたチューブに、20mMEDTA-0.5% Tween 20-PBS溶液を1ml加える
3. 氷上で肝臓をホモジナイズする
4. 15000rpm、10分、4℃で遠心し、上清を採り、冷蔵保存する (長期保存の場合は冷凍保存)。

希釈試料はELISAサンドイッチ法でピテロジェニンを定量した

## 3) 結果と考察



水中曝露法では10 nMから応答が見られ、100 nMで明らかに上昇した(図9)。1000 nMで合成が増加しないのは、1000 nMより低濃度で合成が最大になるという培養肝細胞の知見と一致する。水中曝露法の場合は、今回7日間の曝露としたが、曝露期間については、検討する必要がある。また、今回は10倍の濃度変化で試験を行ったが1 nM前後の濃度依存的な応答を認めるためには、使用濃度を細かく設定し、多数の個体を用いた曝露実験が必要であると考えられる。

また、注射法では体重あたり0.02 µg投与から応答が見られ、その後投与量依存的に増加した(図10)。水中曝露法と注射法とを直接比較することはできないが、注射法では広範囲で投与量依存性を認めた。逆に水中曝露法では10~100 nMでの急激な上昇が見られた。注射法では投与されたE2が個体内にどのように拡散するか不明であるが、もし個体内に均一に分散したとすると、ここで用いた投与量は体内で7.3 nM~73 µMに相当する。一方水中曝露法ではビテロジェニン産生量は100 nMで約13000 µg/mlであり、注射法による73 nMでは約14000 µg/mlであった。このことは水中曝露法の方が格段に低濃度でエストロゲン作用を検出できることを示す。注射法では、注射されたE2の一部しか体内では作用していないことが考えられる。なお、定量したビテロジェニン濃度を対数で示すことにより、より低濃度側でのE2濃度依存的な影響を視覚的に表すことができた(図9及び10右グラフ)。

検体採取方法の検討では、肝臓ホモジネートを用いると、血漿を用いたときよりもビテロジェニン測定値が低く出る傾向が見られ、バラツキが大きい。応答曲線のパターンはほぼ同一と言える。したがって、採血可能な成体を用いるときには血漿を利用した方が良好な結果を得られると考えられるが、幼生など小さい個体を用いるときには肝臓ホモジ

ネートの利用も有効であることが示された。

## 実施例 2 - 2 : 初代培養肝細胞を用いた試験

### 1) 材料と方法

#### A : 薬品

○10×灌流液 (0.14% KCl、5.5% NaCl、0.44% pyruvate、1% glucose、2.38% HEPES、5% BSA、0.2% NaHCO<sub>3</sub>)

○コラゲナーゼ灌流液 (1×灌流液をフェノールレッドで pH 7.2 ~ 7.5 にあわせ、0.1% コラゲナーゼ溶液とする。ろ過滅菌)

○培養液 (50% L-15、1 μg/ml インシュリン、0.5% グルコース、antibiotics)

#### B : 肝細胞採取方法

1. カエルを過マンガン酸カリウム (5 mg/ml) の中で2時間以上消毒する (表皮が褐色になる)

2. 腹腔へ麻酔薬 (20 mg/ml - aminobenzoic acid ethylester) を0.5 ~ 1.0 ml 注射する

3. 腹側皮膚をアルコール棉でよく消毒し、開腹する

4. 心臓を露出させ、心室から注射針を差込み、肝静脈を通してコラゲナーゼ灌流液をペリスタポンプで送り込んで肝臓を灌流する

5. 肝臓を取り出しピーカーに移し、はさみで細かく切る

6. 少量のコラゲナーゼ灌流液とともに L 型チューブに移す

7. 24°C のインキュベータで30 ~ 60分震盪する

8. ピペットでよく懸濁し、ナイロン網を通してろ過する

9. 培養液を少量加え、300 rpm で1 ~ 2分間遠心する

10. 遠心上清を吸引除去し、培養液を加え再度遠心する (この操作を2回繰り返す)

1 1. 細胞濃度を血球計測板で測定し、1mlあたり10万～20万个まで希釈する

1 2. マイクロプレートに100～300  $\mu$ l ずつ蒔く(2万个/well程度がよい)

1 3. 24℃インキュベータ中で培養する

#### C: 試験方法

培養液中に試験物質を加えて培養する方法で処理を行う。

培養1日目くらいから肝細胞は機能回復し、細胞のプレートへの接着・伸展がおこるため、培養2日目あたりから試験物質を含む培養液に交換し、8日目の培養液を採取してELISA法によるピテロジェニン検出に用いる。培養液は3日に一回交換する(多く細胞を蒔きすぎると交換を頻繁に行わなければいけない)。E2処理の場合、処理3日目あたりから培養液中のピテロジェニンを検出することができることが知られているが、生着した培養肝細胞は3週間は安定しているため、作用性の低い物質の試験にはより長期間のアッセイを行う。

#### 2) 結果と考察

培養肝細胞を用いたアッセイの場合、E2 0.6 nM以上の曝露濃度で、濃度に依存して有意なピテロジェニン濃度の増加が認められた(図11)。また、個体を用いる場合より測定値のバラツキが少なく、再現性が高い。特に、個体を用いた水中曝露実験よりも低濃度側でのE2濃度依存的なピテロジェニン合成が認められた。

その他、培養肝細胞を用いる利点としては、

- ・多数の試料を一度に検定でき、経済的である。
- ・分泌蛋白質なので培養液をそのまま検定に使用すれば良く、迅速かつ簡便である。
- ・生体内のホルモン等に影響されず、肝細胞の応答が直接検定できる。

- ・ 厳密な曝露条件設定が可能である。
- ・ 検出システムをマニュアル化でき、特別な技能を要さない。

などが挙げられる。

### <実施例 3. ビテロジェニンアッセイの高感度化>

実施例 3 では、雌性ホルモン作用を有する化学物質の両生類に対する影響評価を行うための、アフリカツメガエル雄を用いたビテロジェニン (VTG) アッセイの高感度化をはかるため、アフリカツメガエルの VTG ポリクローナル抗体を新たに作製し、アフリカツメガエルの VTG ELISA KIT の最適化を行うと共に、ELISA KIT を作製し、測定精度の評価を行った。

#### A. 方法

##### 1. アフリカツメガエルの VTG ポリクローナル抗体の作製

##### (1) アフリカツメガエル VTG 抗原の精製

アフリカツメガエル成体雄に 10 mg/ml  $17\beta$ -エストラジオール (E2) を含むプロピレングリコール溶液を 30  $\mu$ g/g 体重相当の量で注射し、VTG の合成誘導を行った。10 日間の飼育後に採取した血清 0.5 ml ずつを陰イオン交換クロマトグラフィーシステム (QAE-Sephadex、Bio-Rad エコノシステム) で分離精製した。

#### 分離条件

カラム : QAE-Sephadex A50 を A 液 (下記参照) で膨潤させ、直径 1 cm、長さ 10 cm のオープンカラムにつめる

流速 : 0.5 ml/min

分画 : 3 ml/試験管

バッファークラジェント条件

- ・ A 液 : 0.1M Tris-HCl (pH6.5)
- ・ B 液 : 0.1M Tris-HCl (pH6.5) / 0.5 M NaCl

<u>time(min)</u>	<u>%B 液</u>
0	0
20	0
200	0-80
260-	80

VTG 溶液の濃縮には、ゲルろ過担体 (Sephadex-G25) を用いた。濃度定量には BCA (Bicinchoninic Acid) Protein Assay Kit (PIERCE) を用いて行い、BSA (牛血清アルブミン) 換算量とした。また、純度の確認のため、SDS-7.5% アクリルアミドゲル電気泳動 / CBB (Coomassie blue) 染色を行った。この VTG 精製品は、免疫用抗原および ELISA 標準品作製用として用い、残りを 0.5 mg/ml の 50% グリセロール溶液として、 $-20^{\circ}\text{C}$  で保存した。

## (2) 免疫、および抗体の精製と標識

ポリクローナル抗体作製のため、ウサギへの免疫を行った。抗体価が上昇したウサギから順次全採血を行い、IgG 分画とした。アフリカツメガエルの VTG に対する抗体の純化のため、吸収精製用カラムおよび、アフィニティ精製用カラムを作製した。

### 吸収精製用カラムの作製

アフリカツメガエル正常雄血清 2 ml (約 100 mg のタンパク質を含む) と、5 g の CNBr 活性化 Sepharose 4B とを、カップリング反応により共有結合させた。

### アフィニティ精製用カラムの作製

アフリカツメガエルの VTG 抗原 50 mg と、7.5 g の CNBr 活性化 Sepharose 4B とを、カップリング反応により共有結合させた。

図 13 に示すように、抗 VTG ウサギ血清 IgG 画分 (およそ 200 mg 分)

を上記吸収精製用カラムと混合し、室温で 30 分振とうした。これをろ過することにより、アフリカツメガエル正常雄血清中のタンパク質に対する抗体を除去した。さらに、このろ過液を上記アフィニティ精製用カラムと混合し、4°Cで一晩振とうした後、カラムに結合した抗体を溶出した。精製による抗体価の上昇は ELISA 法により確認した。

さらに、得られたアフィニティ精製ポリクローナル抗体の一部を、過ヨウ素酸酸化法 (Conjugation of Horseradish Peroxidase to Antibodies : Current Protocols in Molecular Biology, 11.1.2) により西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) と共有結合させ、HRP 標識ポリクローナル抗体を作製した。

### (3) 抗体の特異性の確認

SDS-7.5%アクリルアミドゲルを作製し、E2 (約 1 mg) を注射により投与したアフリカツメガエル成体雄血清およびアフリカツメガエル正常雄血清をそれぞれ 0.025  $\mu$ l 相当と、精製 VTG 抗原 100 ng 相当を電気泳動し、ゲル中の分離タンパク質をセミドライ法によりメンブレンにブロッティングした。抗 VTG アフィニティ精製ポリクローナル抗体 1  $\mu$ g/ml で免疫反応を行ったのち、HRP 標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体 (二次抗体) と反応させ、化学蛍光発色法により VTG を X 線フィルム上で検出した。これにより抗体の特異性を検証した。

## 2. ELISA KIT の最適化

上述したように、ELISA 拮抗法に比べ ELISA サンドイッチ法がより低濃度の感度が良いことがわかったため、サンドイッチ法に基づいた ELISA KIT を作製することとした。サンドイッチ法の概略は以下に示す。そして、新たに作製したアフリカツメガエルの VTG ポリクローナル抗体について、この ELISA 法の各反応段階についての最適化を試みた。

### ELISA サンドイッチ法概略

1. マイクロプレートの固相化（吸収精製 VTG 抗体 50  $\mu$ l、4°C、一晚）  
洗淨：洗淨液 300  $\mu$ l 3 回、30 分間
2. ブロッキング剤によるプレートのブロッキング
3. 試料または標準液の反応 50  $\mu$ l、室温 1 時間  
洗淨：洗淨液 300  $\mu$ l、3 回
4. 標識抗体の反応（HRP 標識抗 VTG 抗体 50  $\mu$ l、室温 1 時間）  
洗淨：洗淨液 300  $\mu$ l、3 回
5. 発色（発色液 100  $\mu$ l、室温 30 分～1 時間放置）
6. 405 nm の吸光度をプレートリーダーで測定

（1）ELISA 反応条件の最適化

i) 固相化 VTG 抗体の濃度

プレートの固相化に用いるアフィニティ精製 VTG ポリクローナル抗体の濃度を、1.25  $\mu$ g/ml、2.5  $\mu$ g/ml、および 5  $\mu$ g/ml に設定し、1 時間室温で固相化を行い、標準 VTG 0～1000 ng/ml の範囲で標準曲線を作成した。また、適正化された 1.4  $\mu$ g/ml の濃度で一晩 4°C で固相化したものを用いて、同時に標準曲線を作成した。結果を比較し、最適な固相化 VTG 抗体濃度を検討した。

ii) HRP 標識 VTG 抗体の濃度

本 VTG ポリクローナル抗体への HRP 標識効率によって、ELISA の検出感度が左右されることが考えられるため、HRP 標識 VTG 抗体の使用濃度の最適化は必要である。今回作製した HRP 標識 VTG 抗体について、1  $\mu$ g/ml、2  $\mu$ g/ml、および 4  $\mu$ g/ml の濃度で条件を設定し、ELISA における本 HRP 標識 VTG 抗体の最適な濃度を検討した。

iii) 血漿サンプル希釈液の組成 — 添加回収試験 —

アフリカツメガエルの血漿サンプル中の VTG 測定時に関わる条件検討を行うため、添加回収実験を行い、ELISA の改良を行った。正常雄血漿

について希釈系列 (1/20, 1/200, 1/1000, 1/5000, 1/20000, 1/100000) を作製し、それぞれに 500 ng/ml, 100 ng/ml, 20 ng/ml となるように標準 VTG を加えた試料を作製した。血漿希釈に用いる希釈液には、サンプル希釈液 (0.5% 雪印ブロックエース-0.1% Tween 20-10 mM EDTA-PBS) と、サンプル希釈液に BSA を最終 1% になるように加えたものを用いた。それぞれの希釈液を用いた標準曲線をもとにして試料中の VTG 濃度を定量し、添加量に対する回収率を求めた。さらに、希釈直線性の確認のため、1% BSA を加えた希釈液を用いて、血漿サンプル 1 および血漿サンプル 2 (いずれも、10 nM E2 を 7 日間水中曝露した雄の血漿) を 1/400 希釈から 1/2 希釈系列で測定し、VTG 定量を行った。

## (2) 血漿サンプル調整方法の最適化

### i) 生体からの採血方法 (採血箇所の検討)

アフリカツメガエルの生体からの採血方法として、皮下の血管が密集している脇下、血管が見やすい水掻き、および爪切除面の 3 箇所からの採血方法を比較し、最適化の検討を行った。

## 3. ELISA KIT の評価

### (1) 標準曲線の作成

本 ELISA KIT を用いて標準曲線の作成を行った。1000 ng/ml とした VTG 溶液から 1/3 もしくは 1/2 希釈系列 (1000 ng/ml ~ 2 ng/ml, 0 ng/ml) を作製し、キットプロトコルに基づいて行った。

### (2) 精度の評価

アフリカツメガエル VTG 標準液を用いて、4 重測定で標準曲線を作成し、95% 信頼できる最低検出限界値 (VTG 濃度ゼロ点の平均値 + 2 × 標準偏差 (2SD)) を求め、感度の評価を行った。また、各測定点における相対標準偏差 (%CV) を求め、精度の評価を行った。

## 4. その他 (新たな知見、および本 ELISA KIT の応用方法について)



### (1) 標識法に関する新たな知見

本 ELISA KIT のさらなる高感度化につながる知見として、ビオチン化抗体-HRP 標識ストレプトアビジンを用いた ELISA に関する結果を得た。

### (2) 種間交差反応性

本抗体の、アフリカツメガエル以外のカエルの VTG に対する交差反応性とその程度を調べるため、Xenopus 属の近縁種であるトロピカリス、Bombina 属であるスズガエルおよび Rana 属であるツチガエル、ヌマガエル、トノサマガエル、および Hyla 属のニホンアマガエル、Rhacophorus 属のシュレーゲルアオガエルに対して、E2 (約 1 mg) を注射し、6 日間飼育した後、血清を採取した。各血清を 1/200 から段階的に希釈し ELISA による VTG 定量を行い、アフリカツメガエルの VTG 標準曲線から VTG 濃度を求め、他種カエル VTG の換算量を求めた。次に、この換算量を元に、本抗体により認識される VTG 量が等量となるように SDS-PAGE でそれぞれのカエル血清タンパク質を分離し、CBB 染色を行った。CBB 染色ゲル写真における約 200 kDa の位置のバンドの濃さの比較によって、交差反応度を表した。

### (3) アフリカツメガエル初代培養肝細胞

本 ELISA KIT の用途として、アフリカツメガエルの肝細胞培養液中の VTG 濃度定量への応用についても検討した。上述した実施例と同様の方法を用いて、アフリカツメガエル成体雄の肝細胞を初代培養し、E2、エストロン (E1)、エストリオール (E3) など、既知のエストロジェン作用物質を含む培養液で培養した。培養開始から 6 日後 (3 日目に交換) の培養液について、本 ELISA KIT による VTG 濃度定量を行った。

## B. 結果

### 1. アフリカツメガエルの VTG ポリクローナル抗体の作製

#### (1) VTG 抗原の精製

E2の注射により VTG が合成誘導されたアフリカツメガエル成体雄の血清 0.5 ml ずつを、陰イオン交換クロマトグラフィーシステムで分離精製した。(図 1 4) のように、約 140 分後あたりから VTG を含む UV レコーダーのピークが出現する。最後のピークが VTG で、その前のピークが血清アルブミンである。

VTG 濃度のピークを含む 10 本前後のフラクションを SDS-PAGE/CBB 染色で確認し (図 1 4)、血清アルブミンを含まないフラクションを集めた。

BCA 試薬により、BSA 換算量として VTG 溶液の濃度を決定した。8 回の多重測定の結果、変動は 1.5% 未満であった (図 1 5)。SDS-PAGE/CBB 染色の結果、およそ 200 kDa の分子量の位置に検出された (図 1 6)。決定した新しい VTG 標準品の濃度を元に、旧標準品との ELISA 法による比較を行ったところ、標準曲線は一致した (図 1 7)。以上の適正化を精製ロット毎に行うことにより、VTG 標準品の安定供給が行える。また、ELISA KIT 作製に用いた VTG 標準品以外は、50% グリセロール溶液とし、-20°C で保存することとした。これより、VTG の変性沈殿を避けることができるため、長期保存が可能であることがわかった。最終的に、アフリカツメガエルに 30  $\mu$ g/g 体重相当の量で E2 を注射した成体雄の血清から、約 13 mg の VTG が精製できた。

## (2) 抗体の精製と標識

VTG 抗原を免疫したウサギから得られた IgG 分画を、吸収精製およびアフィニティ精製した。その結果、アフリカツメガエル VTG ポリクローナル抗体について約 10 倍程度の抗体価の上昇が見られた (図 1 8)。また、1979 年に作製されたアフリカツメガエルの VTG ポリクローナル抗体 (IgG 精製前の抗血清の状態で -80°C 保存していたもの) を吸収精製およびアフィニティ精製したものと抗体価を比較すると、ほぼ等しい抗体価

であった（図 19）。これは、異なる免疫によって得られたポリクローナル抗体でも、アフィニティ精製を行うことによって、同程度の免疫反応を示す抗体を得ることができることを示している。

### （3）抗体の特異性の確認

E2 を注射したアフリカツメガエル成体雄の血清、および正常な成体雄の血清からそれぞれ 0.025  $\mu$ l 相当を SDS-PAGE で分離し（図 20（a））、新たに作製した抗体による免疫染色を行った。アフィニティ精製により抗体の VTG に対する特異性が確かになり、正常成体雄の血清タンパク質とは免疫反応を示さなかった（図 20（b））。これにより、VTG に非常に特異性の高いポリクローナル抗体が得られたことが確認された。また、アフリカツメガエル血清中の VTG は分解されやすく、低分子側に分解産物がわずかに見られた。

## 2. ELISA KIT の最適化

### （1）ELISA 反応条件の最適化

#### i) 固相化 VTG 抗体の濃度

プレートの固相化に用いるアフィニティ精製 VTG 抗体の濃度を 1.25  $\mu$ g/ml、2.5  $\mu$ g/ml、5  $\mu$ g/ml で 1 時間の固相化、および 1.4  $\mu$ g/ml の濃度で一晩の固相化、に設定し標準曲線を作成した（図 21）。その結果、2.6  $\mu$ g/ml 以上で十分な反応が得られたが、1.4  $\mu$ g/ml の濃度でも、一晩固相化させることによって、5  $\mu$ g/ml の固相化条件の結果に近い反応性が得られた。このような検討の結果、本 ELISA での固相化条件は、アフィニティ精製 VTG 抗体 1  $\mu$ g/ml を 50  $\mu$ l/well、4°C 一晩、とした。

#### ii) HRP 標識 VTG 抗体の濃度

今回作製した HRP 標識 VTG 抗体について、1  $\mu$ g/ml、2  $\mu$ g/ml、および 4  $\mu$ g/ml の濃度条件で ELISA を行い、標準曲線を作成した（図 22）。その結果、図のように、HRP 標識抗体の濃度が濃くなるほど全体的な発色

度が強くなったが、抗体濃度が濃すぎると陰性対照の非特異的な反応が増加することや、同ロットから作製できる抗体の量などを考慮して、本ロットでは抗体を  $2\mu\text{g/ml}$  の濃度で使用することが最適であると判断した。

### iii) 血漿サンプル希釈液の組成 — 添加回収試験 —

アフリカツメガエルの正常雄血漿を 1/20 から 1/100000 までの希釈系列をつくり、それぞれに 500 ng/ml, 100 ng/ml, 20 ng/ml となるように標準ピテロジェニンを加えた試料を作成し、定量した。

血漿はかなり高い反応阻害効果を示し、1/20 希釈では約 85% の阻害が見られた。血漿を希釈するにつれて、回収率が高くなり、1/100000 以上の希釈で期待値に近いピテロジェニン定量値となった (図 2 3 (a))。また添加したピテロジェニン量の違いに関わらず、血漿希釈倍率によって回収率がほぼ一定で、 $\pm 10\%$  の誤差程度であった。なお、正常雄血清中のピテロジェニンは ELISA の検出限界以下であった。次に、BSA を 0.5% および 1% の濃度で加え、上記同様の方法で VTG の添加回収実験を行ったところ、BSA 濃度が濃いほど、回収率における血漿阻害効果が軽減した (図 2 3 (a) ~ (c))。測定サンプル中の最終濃度が 1% となるように BSA を加えた場合、血漿を少なくとも 200 倍希釈することによって、回収率が 90% 以上となった (図 2 3 (c))。このような回収率の改善は、あらかじめ標準曲線に反応阻害を織り込んでいることに起因する (図 2 3 (d))。

また、実際に E2 曝露により VTG 誘導を行った成体雄の血漿を希釈し VTG 定量を行ったところ、1/400 以下の希釈率から VTG 濃度の希釈直線性が得られた (図 2 4)。

以上のことから、検体希釈液に最終濃度 1% となるように BSA を加えることを決定した。

以上の検討の結果、ELISA の条件は以下のように設定した。なお、ブロッキング剤および発色基質について変更を加えた。

- 1) 固相化用アフィニティ精製 VTG 抗体溶液 ( $1\mu\text{g/ml}$  in PBS) を  $50\mu\text{l}$  ずつウェルに加え、 $4^{\circ}\text{C}$ で一晩おく (Nunc-Immno Plate II)
- 2) ウェルの溶液を捨て、洗浄液 ( $0.1\%$  Tween 20-PBS)  $300\mu\text{l}$  で 3 回洗浄
- 3) ブロッキング液 ( $0.5\%$  雪印ブロックエース- $0.1\%$  Tween 20- $10\text{ mM}$  EDTA-PBS)  $300\mu\text{l}$  を加え、室温 1 時間
- 4) ウェルの溶液を捨て、洗浄液 ( $0.1\%$  Tween 20-PBS)  $300\mu\text{l}$  で 1 回洗浄
- 5) サンプル希釈液で検体および標準 VTG 抗原を希釈した溶液を  $50\mu\text{l}$  ずつウェルに加え、室温 1 時間。  
・標準曲線は、 $1000\text{ ng/ml}$  とした VTG 溶液から  $1/3$  希釈系列 ( $1000\text{ ng/ml}$  ~  $1\text{ ng/ml}$ ,  $0\text{ ng/ml}$ ) を作製する。
- 6) ウェルの溶液を捨て、洗浄液 ( $0.1\%$  Tween 20-PBS)  $300\mu\text{l}$  で 3 回洗浄する
- 7) HRP 標識抗体を抗体希釈液 ( $0.5\%$  雪印ブロックエース- $0.1\%$  Tween 20-PBS) で希釈し、 $2\mu\text{g/ml}$  とした溶液を  $50\mu\text{l}$  ずつウェルに加え、室温 1 時間
- 8) ウェルの溶液を捨て、洗浄液 ( $0.1\%$  Tween 20-PBS)  $300\mu\text{l}$  で 3 回洗浄する
- 9) 発色液 (TMBZ 発色基質液を発色基質希釈液で 100 倍希釈) を  $100\mu\text{l}$  ずつウェルに加え、室温 1 時間
- 10) 反応停止液 ( $1\text{ N}$  硫酸) を  $100\mu\text{l}$  ずつウェルに加える
- 11)  $450\text{ nm}$  の吸光度をプレートリーダーで測定 (大日本製薬: Multiskan JX)

## (2) 血漿サンプル調整方法の最適化

### i) 生体からの採血方法（採血箇所の検討）

アフリカツメガエルの生体からの採血方法として、皮下の血管が密集している脇下、血管が見やすい水掻き、および爪切除面の3箇所からの採血方法を比較し、最適化の検討を行った。その結果、水掻きの血管からの採血は、①染み出る血液量が少ないこと、②染み出た血液がにじんでしまい、採血しづらいこと、③切断した血管がかなり治癒しづらいことが分かり、採血法に適していないと判断した。また、爪切除による採血は、①染み出る血液量が少ないこと、②切断面の治癒が遅いことが分かり、採血法に適していない。脇の下から脇腹にかけて注射針を刺す採血法は、①染み出た血液が玉状になるため採血しやすい、②刺し傷が治癒しやすい、などの理由から、採血方法として適していると判断した。さらに、採血方法の最適化を行った結果、以下の方法が採血方法の例としてあげられた。

#### 採血方法（図2.5参照）

- 1) マイクロチューブにサンプル希釈液 200  $\mu$ l を入れ、氷上に準備しておく
- 2) カエルをティッシュペーパーなどで包み、手でしっかりと捕まえる
- 3) ティッシュペーパー等で、カエルの脇下の水分を取り除く
- 4) 脇腹の、背側と腹側の境界線部分を注射針で軽く刺す
- 5) 出てきた血液をマイクロピペットで 1~10  $\mu$ l 測り取り、氷上に用意していたサンプル希釈液に入れ、遠心するまで氷上で保存する
- 6) マイクロチューブを 4°C、8000 rpm で 5 分間遠心し、上清を別のマイクロチューブに移し、血漿サンプルとして測定時まで凍結保存する

## 3. ELISA KIT の評価

### (1) 標準曲線の作成

本 ELISA KIT を用いて標準曲線の作成を行った。1000 ng/ml とした VTG 溶液から 1/2 希釈系列 (1000 ng/ml ~ 2 ng/ml, 0 ng/ml) を作製し、ELISA KIT プロトコル (巻末添付) に基づいて行った結果、図 2 6 のような標準曲線が描かれた。

得られた標準曲線は、VTG 濃度 0 から 125 ng/ml まで一次直線性が見られ、125 ng/ml ~ 1000 ng/ml まで対数直線性が見られた。また、図には示していないが、両対数グラフを作成した場合、8 ~ 125 ng/ml で直線性が見られた。

各測定点の吸光度の平均値、および標準偏差 (SD) 相対標準偏差 (% CV) は図 2 7 に示す結果となった。

## (2) 精度の評価

図 2 6 に示した標準曲線および図 2 7 の数値から、精度の評価を行った。

4 重測定時の 95% 信頼できる標準 VTG の最低検出限界濃度を、《VTG 濃度ゼロ点の平均値 + 2SD》として求めた結果、およそ 2 ng/ml となった。また、測定値のバラツキを %CV 値で表した結果、バラツキは平均して 5% で、良好であった。これより、本 ELISA KIT は 2 ng/ml から 1000 ng/ml の濃度範囲で定量性があることがわかった。

## 4. その他 (新たな知見および本 ELISA KIT の応用方法について)

### (1) 標識法に関する新たな知見

本 ELISA KIT のさらなる高感度化につながる知見として、ビオチン化抗体-HRP 標識ストレプトアビジンを用いた ELISA 法について、新たな知見が得られた。ビオチン化したアフィニティ精製 VTG ポリクローナル抗体と HRP 標識ストレプトアビジンを用いた ELISA 法により標準曲線を作成した結果、図 2 8 のような標準曲線が描かれた。

### (2) 種間交差反応性

抗体の交差反応性について、ELISA と SDS-PAGE/CBB 染色実験を行い、本 ELISA キットがアフリカツメガエル以外のカエルの VTG 検出にも応用できる可能性について検討した。E2 (約 1 mg) を種々のカエルに注射し、6 日間飼育後に血清を採取した。各血清 1/200 希釈から希釈系列を作製し、ELISA を行った (図 29 (a))。アフリカツメガエルの VTG 標準品を用いた標準曲線から、各種カエル血清中の、アフリカツメガエル VTG 換算量を求めた。次に、この換算量が等量となるように各種カエル血清を希釈し、SDS-PAGE/CBB 染色を行った (図 29 (b))。この CBB 染色において VTG を示すバンドの濃さが、アフリカツメガエル VTG のバンドの濃さと同じであれば、そのカエル種の VTG は本抗体と交差反応度が 100% に近いことを示している。今回の結果からは、アフリカツメガエルの近縁種であるトロピカリスにおいてのみ、100% に近い交差反応度を示すことがわかった。また、スズガエル VTG にも比較的高い交差反応性を示した。その他の種については、交差反応性は低かった (データは示していない)。

### (3) 初代培養肝細胞

初代培養肝細胞への曝露試験と、本 ELISA との組み合わせにより、種々の化学物質の定量的エストロジェン活性のスクリーニングシステムへの応用について検討した。アフリカツメガエル成体雄の初代培養肝細胞を使って、エチニルエストラジオール (EE2)、ジェチルスチルベストロール (DES)、 $17\beta$  エストラジオール (E2)、 $17\alpha$  エストラジオール ( $\alpha$ -E2)、エストリオール (E1)、エストロン (E3) など、既知のエストロジェン作用物質 6 物質および、ビスフェノール A (BPA)、ノニルフェノール (NP)、オクチルフェノール (OP) などの内分泌攪乱物質と疑われている物質について、VTG 誘導活性を測定した。

(実施例 2-2) と同様の方法を用いて、アフリカツメガエル成体雄



の肝細胞を初代培養し、上記化学物質を含む培養液で培養し、6日後の培養液を用いて、本 ELISA により培養液中 VTG 濃度を定量した。

その結果、各物質とも濃度依存的な VTG 合成誘導が認められ(図 30)、各物質のエストロジェン活性の強さの違いには、既知のヒトエストロジェンレセプターを用いたレポーター遺伝子アッセイにおけるエストロジェン活性と一致する特徴が見られた。また、およそ 0.1 nM E2 相当のエストロジェン活性が検出可能であった。また、ビオチン化抗体を用いた ELISA にて定量を行った場合、およそ 0.03 nM 相当のエストロジェン活性が検出可能であった。このように、本 ELISA KIT は初代培養肝細胞試験への応用も可能である。

さらに、本アッセイシステムを用いることにより、対象物質のアンタゴニスト活性を評価することができた。たとえば、5 nM の E2 と同時に BPA、NP、OP などに加えた培養液で培養したところ、5 nM の E2 のみによる VTG 合成誘導に対して、加えた BPA、NP、OP 濃度が高くなるにつれ、アンタゴニスティックな活性を示した(図 31)。この結果から、培養肝細胞を用いたピテロジェニンアッセイは、様々な化学物質についてエストロジェン活性のみでなく、抗エストロジェン活性についても評価できることが示唆された。

### C. まとめと考察

○新たにアフリカツメガエルの VTG ポリクローナル抗体を作製し、ELISA KIT を製作した。本 ELISA KIT における VTG 濃度定量範囲は 2-1000 ng/ml となった。

新たに作製したポリクローナル抗体を用いてサンドイッチ ELISA 法の条件設定を行い、標準曲線を得た。昨年度は 95%信頼できる最低検出限界《 $n=4$ 、VTG 濃度ゼロ点の平均値+2SD》が 3 ng/ml 程度で 300 ng/ml 程度まで定量的であったのに対し、この新たな抗体を用いた場合は 95%

信頼できる最低検出限界が 2 ng/ml 程度で、上限も 1000 ng/ml 程度まで定量的であり、感度の上昇が見られた。定量範囲の拡大については、プレートへの固相化抗体を吸収精製抗体からアフィニティ精製抗体へ変更したためと思われる。また、低濃度側の感度上昇は、発色剤を ABTS 基質から TMBZ 基質へ変更したことに起因すると考えられる。メダカモノクローナル抗体による ELISA 法 (2-100 ng/ml) と比べると、検出感度は同程度で定量可能範囲は広がった。また、新たな知見から、ビオチン化抗体と標識ストレプトアビジンを用いた方法で ELISA の感度が 30 倍程度上がることが見込まれた。今後、本 ELISA KIT のさらなる感度向上の必要があれば、本抗体のビオチン化抗体の作製、もしくは、特異的でアフィニティの高いモノクローナル抗体を作製する必要がある。

○血漿による阻害効果は、サンプル希釈液に BSA を加えて軽減した。また、VTG の回収率は、血漿を 1/200 以上に希釈することにより、ほぼ 100% となった。血漿阻害効果を考慮すると、本 ELISA KIT による、血漿中の VTG 濃度の最低検出限界は、少なくとも 400 ng/ml である。

血漿はかなり高い反応阻害効果を示し、1/20 希釈では約 85% の阻害が見られた。血漿を希釈するにつれて、回収率が高くなり、1/100000 以上の希釈で期待値に近いビテロジェニン定量値となった。実際に血漿サンプルを定量する場合、この回収率をもとに換算する必要があるが、作業の煩雑化が否めない。そこで、血漿の阻害効果を軽減させるべく、サンプル希釈液の組成の検討を行った。血漿中に含まれるタンパク質により、VTG と抗 VTG 抗体との反応が何らかの原因で阻害されていると考えられる。血漿中に多く含まれるのは血清アルブミンであるため、サンプル希釈液にあらかじめ BSA を添加することを検討した結果、VTG の回収率は、血漿を 1/200 以上に希釈することにより、ほぼ 100% となった。

なお、標準 VTG における最低検出限界が 2 ng/ml であることから、血

漿を少なくとも 200 倍希釈した場合、実際の血漿中 VTG 濃度の最低検出限界は、400 ng/ml となる。ただし図 9c に示されるように血漿 1/20 希釈時の回収率が約 60%であるため、血漿中 VTG 濃度が低いと予想される場合はサンプル調整を血漿 1/20 希釈に設定し、定量値を回収率 60%で換算することも可能である。この場合、実際の血漿中 VTG 濃度の最低検出限界は、約 70 ng/ml となる。

○本 ELISA KIT は、アフリカツメガエル成体雄を 1 nM 以上の E2 に、7 日間の水中曝露を行った時の、血漿 VTG が検出可能である。

上記考察より、最初の実施例におけるアフリカツメガエル成体雄への E2 の水中曝露実験の結果とあわせると、本 ELISA KIT では、アフリカツメガエル成体雄を 1 nM 以上の E2 に、7 日間の水中曝露を行った時の、VTG 合成誘導が検出可能であると言える。今後は、本 KIT を用いて、曝露期間による VTG 誘導量の変化など、試験プロトコルの最適化を行うとともに、必要に応じて ELISA KIT の高感度化が必要であると考えられる。

○本 ELISA KIT に用いた抗体は、アフリカツメガエル以外の他種カエル（トロピカリス、スズガエル、ツチガエル、ヌマガエル、ニホンアマガエル、シュレーゲルアオガエル、トノサマガエル）の VTG にも交差反応を示すことを確認した。

トロピカリス、スズガエルにおいては、交差反応性が高いことが確認された。これら 2 種については、それぞれの VTG を精製することによって、本 ELISA KIT を用いた VTG 定量が可能であると考えられる。その他の種について本 ELISA KIT の適用性を確認するためには、交差反応性をより詳細に検討する必要がある。そのためには、対象とするカエルの VTG を精製するなどして、本 ELISA KIT の活用の範囲と限界を明確にするとともに、交差反応度の低いカエルについては、必要に応じて種特異的な抗体を作製する必要があると考えられる。ただし当面、ビオチン化抗体

と標識ストレプトアビジンを用いれば、高感度化が可能となり、交差反応度の低い他種カエルにも適用可能かもしれない。

○アフリカツメガエルの初代培養肝細胞と本 ELISA KIT を用いたエストロジェン活性試験では、メダカの E2 曝露試験と同様に、およそ 0.1 nM E2 相当のエストロジェン活性が検出可能であった。

アフリカツメガエルの初代培養肝細胞を用いて、エストロジェン活性を持つ既知の物質について試験を行い、誘導された VTG を本 ELISA KIT で定量した結果、各物質のエストロジェン活性の強さの違いには、既知のヒトエストロジェンレセプターを用いたレポーター遺伝子アッセイにおけるエストロジェン活性と、ある程度一致する特徴が見られた。また、およそ 0.1 nM E2 相当のエストロジェン活性が検出可能であった。このように、本 ELISA KIT は初代培養肝細胞試験への応用も可能である。新たな知見ではビオチン化抗体を用いた ELISA にて定量を行った場合、初代培養肝細胞試験では、およそ 0.03 nM 相当のエストロジェン活性が検出可能であり、メダカの E2 曝露試験と同等の結果が得られた。

#### <実施例 4. カエルビテロジェニン ELISA キットの製造>

##### (1) キット原料の製造

##### (1) - 1 抗カエルビテロジェニン抗体

実施例 1 (4) ビテロジェニン抗体の製造例に従った。

##### (1) - 2 ビテロジェニン標準品

実施例 1 (3) ビテロジェニン抗原の製造例に従った。

##### (1) - 3 酵素標識抗体

ペルオキシダーゼ (POD ベーリック EIA 用 CodeNo.814393) を 20 mg/ml の濃度で 0.1 M carbonate buffer, pH9.2、0.5ml に溶かした後、0.5 ml の NaIO<sub>4</sub> 液と 0.5 ml の HRP 液を混ぜ、2 時間、室温・暗所で反応させた。1.0 ml の抗体液 (3 mg/ml in 0.1 M phosphate buffer, pH6.8) を加え、

暗所・室温で3時間保温した。NaBH<sub>4</sub>液(5 mg/ml in 0.1 mM NaOH)を61 $\mu$ l加え、室温・暗所で30分保温し、さらに179 $\mu$ lのNaBH<sub>4</sub>液を加え、60分暗所に置いた。2 mlの飽和硫酸を加え、氷上で攪拌30分を行った。4°Cで15000 rpmで10分間遠心し、沈殿をTEN buffer(50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.9% NaCl) 1 mlに溶かした。TEN buffer平衡化スパンカラムで脱塩後、BSAを20 mg/mlの濃度に溶かした。なお、長期保存の場合は50%グリセロール液とし、-20°Cで保存した。

(2)「抗カエルピテロジェニン抗体固相化マイクロプレート」の製造  
Dulbecco's PBS(-) (和光純薬 CodeNo.041-20211)に溶解した抗ピテロジェニン抗体(1 $\mu$ g/ml)を50 $\mu$ l/wellになるよう固相化プレート(Costar, EIA/RIA plate strip8, #2592)に分注し、4°Cで一晩静置後、洗浄液(0.05%Tween20含有PBS)300 $\mu$ Lで3回洗浄した。ブロッキング液((1% Block Ace (雪印: UK-B80)+1% Sucrose+10mM NaCl+0.05% スラフ 72N (武田薬品) in 5mM Tris-HCl (pH7.5)) 200  $\mu$ L/wellを添加し、4°Cで一晩静置した。アスピレーターで全量を吸引後、タッピングにより水分を除去した。脱水乾燥した固相化プレートをアルミ袋に封入し、真空乾燥機により脱気およびシールをして、2~8°Cの冷蔵庫に保存した。

(3)「ピテロジェニン標準品粉末」の製造

ピテロジェニン希釈液(0.15M NaCl+0.01%スラフ 72N(武田薬品)+4% BSA+10% sucrose in 50mM HEPES-Na (pH7.4))を5 $\mu$ g/mlとなるように希釈し、200 $\mu$ lずつ分注後、凍結乾燥を実施した。

(4)「サンプル希釈液(3倍濃縮)」の製造

Dulbecco's PBS(-) (和光 生化学用 CodeNo.041-20211) 6袋、スラフ 72N (武田薬品) 1.5ml、Tween20 3ml、2Na(EDTA・2Na) (同仁化学試験研究用: Code No.343-01861)、Block Ace (雪印: UK-B80)1 5g、

BSA(Sigma: 7638) 30g を蒸留水 1 L に溶解し、20ml ずつ適切な容器に分注後キャップをして、2~8℃の冷蔵庫に保存した。

(5) 「酵素標識抗体粉末」の製造

酵素標識抗体希釈液(0.15M NaCl+0.01%スラオフ 72N (武田薬品) +4% BSA+10% sucrose in 50mM HEPES-Na (pH7.4))に酵素標識抗体を 60 $\mu$ g/ml となるように希釈し、100 $\mu$ l ずつ分注後、凍結乾燥を実施した。

(6) 「酵素標識抗体希釈液」の製造

Dulbecco's PBS(-) (和光 生化学用 CodeNo.041-20211) 2 袋、スラオフ 72N (武田薬品) 0.5ml、Tween20 1ml、Block Ace (雪印: UK-B80) 5g を蒸留水 1 L に溶解し、7ml ずつ適切な容器に分注後キャップをして、2~8℃の冷蔵庫に保存した。

(7) 「洗浄液 (6 倍濃縮)」の製造

Dulbecco's PBS(-) (和光 生化学用 CodeNo.041-20211) 12 袋、スラオフ 72N (武田薬品) 3ml、Tween20 6ml を蒸留水 1 L に溶解し、50ml ずつ適切な容器に分注後キャップをして、2~8℃の冷蔵庫に保存した。

(8) 「発色基質溶液」の作製

5,5'-テトラメチルベンチジン (TMBZ 同仁化学 試験研究用 CodeNo.346-040301)10mg を、ジメチルホルムアミド(DMF 和光純薬 試験特級 CodeNo.045-02916) 1ml に溶解し、適切な褐色容器に 250 $\mu$ l ずつ分注後キャップをして、2~8℃の冷蔵庫に保存した。

(9) 「発色基質希釈液」の作製

Urea Hydrogen Peroxide (Sigma: U-1753) 350mg、スラオフ 72N (武田薬品) 0.1ml を 40mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-クエン酸緩衝液(pH5.0) 1L に溶解し、適切な容器に 15ml ずつ分注後キャップをして、2~8℃の冷蔵庫に保存した。

(10) 「発色停止液」の作製

1N リン酸溶液を調製し、15ml ずつ適切な容器に分注後キャップをして、室温で保存する。

以上のようにして作製した（１）から（９）迄のキット構成品および混合用マイクロプレート(Nunc: 167008)、箱詰めすることにより、カエルピテロジェニン ELISA キットの製造が完成した。

#### <実施例 5．カエルピテロジェニン ELISA キットによる定量>

実施例 4 により作成したカエルピテロジェニン ELISA キットを使用した定量法は下記の通りである。

##### （１）サンプル希釈液の調製

「サンプル希釈液（３倍濃縮）」と蒸留水を 1: 2 の割合で混合し、「サンプル希釈液」を調製する。

##### （２）サンプル調製

血漿、血清等を（１）で調製した「サンプル希釈液」で定量範囲 (3-1,000ng/mL) に入るよう希釈する。

##### [血漿サンプルの調製法]

- 1) エッペンドルフチューブにサンプル希釈液 200  $\mu$ L を入れ、氷上に準備する。
- 2) カエルを網もしくはティッシュペーパーで包み、手でしっかりと捕まえる (図 2 5 (a))。
- 3) ティッシュペーパー等で、カエルの脇下の水分を取り除く。
- 4) 脇下の、背側と腹側の境界線部分を注射針で軽く刺す (図 2 5 (b))。
- 5) 出てきた血液 (図 2 5 (c)) をマイクロピペットで 1~10  $\mu$ L 測り取り (図 2 5 (d))、氷上に用意していたサンプル希釈液に入れる。チューブは遠心するまで氷上で保存する。
- 6) チューブを 4°C、8000 rpm で 10 分間遠心し、上清を別のマイクロチューブに移して冷蔵保存する。なお、数日中に使用しない場合は、サ

ンプルを測定時まで凍結保存する。

### (3) ビテロジェニン標準液の調製

蒸留水 200  $\mu$ L を用いて「ビテロジェニン標準品粉末」を溶解する (5,000ng/mL)。

その後、「サンプル希釈液」を用いて必要な濃度のビテロジェニン標準液を調製する。なお、5,000ng/mL 溶液は必要量だけ分取し、残りは冷蔵保存する。

#### [調製例]

エッペンドルフチューブ等を使用し、5,000ng/mL を「サンプル希釈液」で 1/5 に希釈し、1,000ng/mL に調製する。次に、マイクロプレート内で 1/4 ずつ希釈し、1,000, 250, 62.5, 15.6, 3.9, 0.98ng/mL を調製する。なお、0 濃度には「サンプル希釈液」をそのまま用いる。

### (4) 抗原抗体反応—1

室温に戻した「抗カエルビテロジェニン抗体固相化プレート」に(2)、(3)で調製した「サンプル」、「ビテロジェニン標準液」をそれぞれ 50  $\mu$ L/well で添加し、室温(18~25°C)で 60 分間反応させる。

### (5) 洗浄液の調製

抗原抗体反応時間中に、「洗浄液 (6 倍濃縮)」と蒸留水を 1:5 の割合で混合し、「洗浄液」を調製する。

### (6) 未反応物の除去—1

反応液を捨て、(5)で調製した洗浄液 300  $\mu$ L/well を用いて well 内を 3 回洗浄する。3 回目の洗浄液を捨てた後は、裏返したマイクロプレートをペーパータオル等の上で軽くたたいて (タッピング)、洗浄液を完全に除去する。

### (7) 酵素標識抗体溶液の調製

「標識抗体粉末」に、「酵素標識抗体希釈液」7mL のうち 3mL を加えて



溶解し、「標識抗体溶液」を調製する。

#### (8) 抗原抗体反応—2

(7) で調製した「標識抗体溶液」を 50  $\mu$ L/well ずつ添加し、室温 (18~25°C) で 60 分間反応させる。

#### (9) 未反応物の除去—2

反応液を捨て、(5) で調製した洗浄液 300  $\mu$ L/well を用いて well 内を 3 回洗浄する。なお、3 回目の洗浄液を捨てた後は、裏返したマイクロプレートにペーパータオル等の上で軽くたたいて (タッピング)、洗浄液を完全に除去する。

#### (10) 発色試薬の調製

「発色基質溶液」と「発色基質希釈液」を 1:100 の割合で混合し、「発色試薬」を調製する。

#### (11) 発色反応／反応停止

(10) で調製した「発色試薬」を 100  $\mu$ L/well 加え、室温で 30 分間反応させた後、「発色停止液」を 100  $\mu$ L/well 添加し反応を停止する。

#### (12) 比色および濃度計算

プレートリーダーを用い、波長 450nm で吸光度を測定する。標準曲線 (図 3 2) から試料中のビテロジェニン濃度を算出する。さらに、ビテロジェニン回収率曲線 (サンプル希釈倍率に対する VTG 回収率) (図 3 3) を使用し、測定値を補正する。なお、本手法による定量範囲は 3-1000 ng/ml であった。また、図 3 3 に示すように、血漿を 200 倍以上希釈すれば 90-100% の回収率が得られることが判った。

### <実施例 6. アビジンビオチン化による高感度 ELISA キットの製造>

実施例 5 の ELISA キットをベースにアビジンビオチン化による高感度 ELISA キットを製造した。

#### (1) キット原料の製造

(1) - 1 抗カエルピテロジェニン抗体

実施例 1 (4) ピテロジェニン抗体の製造例に従った。

(1) - 2 ピテロジェニン標準品

実施例 1 (3) ピテロジェニン抗原の製造例に従った。

(1) - 3 ビオチン標識抗体

Biotin Labeling Kit (Cat. No. 1418 165, Roshe) を用い、付属マニュアルに従った。

(2) 「抗カエルピテロジェニン抗体固相化マイクロプレート」の製造  
実施例 4 (2) に従った。

(3) 「ピテロジェニン標準品粉末」の製造  
実施例 4 (3) に従った。

(4) 「サンプル希釈液 (3 倍濃縮)」の製造  
実施例 4 (4) に従った。

(5) 「ビオチン標識抗体粉末」の製造

ビオチン標識抗体希釈液(0.15M NaCl+0.01%スラオフ 72N (武田薬品)  
+4% BSA+10% sucrose in 50mM HEPES-Na (pH7.4))に酵素標識抗体を  
30  $\mu$ g/ml となるように希釈し、100  $\mu$ l ずつ分注後、凍結乾燥を実施し  
た。

(6) 「酵素標識ストレプトアビジン粉末」の製造

酵素標識ストレプトアビジン希釈液(0.15M NaCl+0.01%スラオフ 72N  
(武田薬品) +4% BSA+10% sucrose in 50mM HEPES-Na (pH7.4))に HRP  
標識ストレプトアビジン (Zymed: 43-8323) を 7.5  $\mu$ g/ml となるように  
希釈し、100  $\mu$ l ずつ分注後、凍結乾燥を実施した。

(7) 「標識体希釈液」の製造

Dulbecco' sPBS(-) (和光 生化学用 CodeNo.041-20211) 2 袋、スラ  
オフ 72N (武田薬品) 0.5ml、Tween20 1ml、Block Ace (雪印: UK-B80) 5g

を蒸留水 1 L に溶解し、15ml ずつ適切な容器に分注後キャップをして、2～8℃の冷蔵庫に保存した。

(8) 「洗浄液 (6 倍濃縮)」の製造

実施例 4 (7) に従った。

(9) 「発色基質溶液」の作製

実施例 4 (8) に従った。

(10) 「発色基質希釈液」の作製

実施例 4 (9) に従った。

(11) 「発色停止液」の作製

実施例 4 (10) に従った。

以上のようにして作製した (1) から (11)迄のキット構成成分および混合用マイクロプレート(Nunc: 167008)、箱詰めすることにより、アビジンビオチン化による高感度 ELISA キットが完成した。

<実施例 7. 高感度 ELISA キットによる定量>

実施例 6 により作成した高感度 ELISA キットを使用した定量法は下記の通りである。

(1) サンプル希釈液の調製

実施例 5 (1) に従う。

(2) サンプル調製

実施例 5 (2) に従う。

(3) ビテロジェニン標準液の調製

蒸留水 200  $\mu$ L を用いて「ビテロジェニン標準品粉末」を溶解する (5,000ng/mL)。

その後、「サンプル希釈液」を用いて必要な濃度のビテロジェニン標準液を調製する。なお、5,000ng/mL 溶液は必要量だけ分取し、残りは冷蔵保存する。

## [調製例]

エッペンドルフチューブ等を使用し、5,000ng/mL を「サンプル希釈液」で 1/80 に希釈し、62.5ng/mL に調製する。次に、マイクロプレート内で 1/2 ずつ希釈し、31.3, 15.6, 7.8, 3.9, 2, 0.98, 0.49, 0.24, 0.12, 0.06, 0.03, 0ng/mL を調製する。なお、0 濃度には「サンプル希釈液」をそのまま用いる。

## (4) 抗原抗体反応—1

室温に戻した「抗カエルピテロジェニン抗体固相化プレート」に(2)、(3)で調製した「サンプル」、「ピテロジェニン標準液」をそれぞれ 50  $\mu$ L/well で添加し、室温(18~25°C)で 60 分間反応させる。

## (5) 洗浄液の調製

抗原抗体反応時間中に、「洗浄液 (6 倍濃縮)」と蒸留水を 1:5 の割合で混合し、「洗浄液」を調製する。

## (6) 未反応物の除去—1

反応液を捨て、(5)で調製した洗浄液 300  $\mu$ L/well を用いて well 内を 3 回洗浄する。3 回目の洗浄液を捨てた後は、裏返したマイクロプレートをペーパータオル等の上で軽くたたいて (タッピング)、洗浄液を完全に除去する。

## (7) ビオチン標識抗体溶液の調製

「ビオチン標識抗体粉末」に、「標識体希釈液」15mL のうち 3mL を加えて溶解し、「ビオチン標識抗体溶液」を調製する。

## (8) 抗原抗体反応—2

(7)で調製した「ビオチン標識抗体溶液」を 50  $\mu$ L/well ずつ添加し、室温(18~25°C)で 60 分間反応させる。

## (9) 未反応物の除去—2

反応液を捨て、(5)で調製した洗浄液 300  $\mu$ L/well を用いて well 内

を3回洗浄する。なお、3回目の洗浄液を捨てた後は、裏返したマイクロプレート进行ペーパータオル等の上で軽くたたいて（タッピング）、洗浄液を完全に除去する。

#### （10）酵素標識ストレプトアビジン溶液の調製

「酵素標識ストレプトアビジン」に「標識体希釈液」15mLのうち3mLを加えて溶解し、「酵素標識ストレプトアビジン溶液」を調製する。

#### （11）ビオチンとストレプトアビジンの反応

（10）で調製した「酵素標識ストレプトアビジン溶液」を50 $\mu$ L/wellずつ添加し、室温（18～25 $^{\circ}$ C）で60分間反応させる。

#### （12）未反応物の除去－2

反応液を捨て、（5）で調製した洗浄液300 $\mu$ L/wellを用いてwell内を3回洗浄する。なお、3回目の洗浄液を捨てた後は、裏返したマイクロプレート进行ペーパータオル等の上で軽くたたいて（タッピング）、洗浄液を完全に除去する。

#### （13）発色試薬の調製

「発色基質溶液」と「発色基質希釈液」を1:100の割合で混合し、「発色試薬」を調製する。

#### （14）発色反応／反応停止

（13）で調製した「発色試薬」を100 $\mu$ L/well加え、室温で30分間反応させた後、「発色停止液」を100 $\mu$ L/well添加し反応を停止する。

#### （15）比色および濃度計算

プレートリーダーを用い、波長450nmで吸光度を測定する。標準曲線（図34）から試料中のピテロジェニン濃度を算出する。さらに、ピテロジェニン回収率曲線（サンプル希釈倍率に対するVTG回収率）を使用し、測定値を補正する。なお、本手法による定量範囲は0.06-62.4 ng/mlで従来法に比べ、50倍高感度化されていることがわかった。また、図35

に示すように、血漿を 50 倍以上希釈すれば希釈直線性が得られることが判った。

なお、本発明は上述した実施形態に限定されるものではない。例えば、検出キットにおける測定プレートに代えてイムノクロマト法を用いても勿論構わない。

イムノクロマトグラフィー法は原理としてはサンドイッチ法を用いており、妊娠判定法など広く利用されている。ここで、本実施形態におけるイムノクロマトグラフィーストリップ 1007 について図 36 に基づき説明する。

図 36 に示すように、イムノクロマトグラフィーストリップ 1007 は、プラスチックカバー 1001a、1001b との間に、サンプルパッド 1002、コンジュゲートパッド 1003、メンブレン 1006 及び吸収パッド 1008 を挟持した構造となっている。メンブレン 1006 には、判定ライン 1004 とコントロールライン 1005 用抗体(抗ウサギ IgG 抗体)がそれぞれ所定の位置に塗布されている。

プラスチックカバー 1001a、1001b で覆われた中に検体を滴下すると、サンプルパッド 1002、その下のコンジュゲートパッド 1003 の中に浸透してそこで金コロイドを標識した VTG 抗体と反応しながら横方向(図中左→右)に浸透していく。

判定ライン 1004 には固相化された抗体がありそこを通過するとき抗原抗体反応が起こり赤色を呈し、一部はその先のコントロールライン 1005 で固相化された標識抗体特異抗体と反応し赤色を呈する。陽性では判定ラインとコントロールラインの二本、陰性ではコントロールラインの一本のみ呈色する。

次に、イムノクロマトの製造方法について説明する。

メンブレン 1006 に、判定ライン 1004 用抗体(抗 VTG 抗体)とコン

トロールライン 1005 用抗体(抗ウサギ IgG 抗体)をラインになるように塗布し、乾燥して固定化し非特異吸着を押さえるためのブロッキングを行い更に洗浄して抗体の塗布が終了する。そして図 36 に示すように、プラスチックカバー 1001a、1001b によりこれを含めた各種部材を挟持することで、イムノクロマトを製造している。

次に、このイムノクロマトを用いた具体的な測定方法を説明する。

はじめに、既知濃度のピテロジェニンサンプルを用いて測定し、20 ng/ml ~10 mg/ml の測定レンジであることを確認した。次に、1 nM E2 で 1 週間暴露したアフリカツメガエル雄成体より血液を採取し、得られた血清を 3 段階 (×1、×100、×10,000) に希釈し、その 100  $\mu$ l をサンプルパッド 1002 に滴下した。約 15 分ほど静置したのち、陰性になった希釈段階から、ピテロジェニンの濃度範囲を特定した。本キットで特定した濃度範囲は、ELISA 法により定量した濃度を比較したところ、すべて一致する結果が得られた。

#### 産業上の利用可能性

以上説明したように、本発明の検出キット、検出方法及び環境の評価方法によれば、カエルのピテロジェニンを感じ度、精度ともに良好に検出することが可能となり、それにより環境中の内分泌攪乱化学物質の影響を網羅的に評価することが可能となる。

## 請 求 の 範 囲

1. 試料が注入される有底の穴を有するプレート本体と、前記穴の表面に固相化され、カエルピテロジェニンを認識する1次抗体とを有する測定プレートと、

前記1次抗体が固相化された穴に注入される標準カエルピテロジェニンと、

前記試料又は前記標準カエルピテロジェニンが注入された穴に注入され、前記カエルピテロジェニンを認識する2次抗体と

を具備することを特徴とする検出キット。

2. 前記試料がカエルの血漿もしくは血清であることを特徴とする請求項1に記載の検出キット。

3. 前記2次抗体が、標識化合物により標識されていることを特徴とする請求項1に記載の検出キット。

4. 前記1次抗体は、前記穴の表面に吸着し、ブロッキング剤で前記穴の表面がブロックされていることを特徴とする請求項1に記載の検出キット。

5. 試料と、カエルピテロジェニンを認識し、標識化合物により標識された抗体が注入、混合される有底の穴を有する第1のプレートと、

前記試料と抗体の混合液が注入される有底の穴を有する第2のプレートと、

前記第2のプレートの穴の表面に抗原として固相化された標準カエルピテロジェニンと

を具備することを特徴とする検出キット。

6. 前記試料がカエルの血漿もしくは血清であることを特徴とする請求項5に記載の検出キット。



7. 前記抗原は、前記第2のプレート穴の表面に固相化され、ブロッキング剤でブロックされていることを特徴とする請求項5に記載の検出キット。

8. 試料が注入される有底の穴を有するプレート本体と、  
前記穴の表面に固相化され、カエルピテロジェニンを認識する1次抗体と、

を具備することを特徴とする測定プレート。

9. 試料と、カエルピテロジェニンを認識し、標識化合物により標識された抗体との混合物が注入される有底の穴を有するプレート本体と、

前記プレートの穴の表面に固相化された抗原としてのカエルピテロジェニンと

を具備することを特徴とする測定プレート

10. 請求項1～7のいずれか1項に記載の検出キットを用いてカエルピテロジェニンを検出することを特徴とする検出方法。

11. 試料と、前記試料中に含まれるピテロジェニンを認識する1次抗体とを反応させる工程と、

前記試料中に含まれるピテロジェニンと前記抗体の複合体に、前記ピテロジェニンを認識する2次抗体とを反応させる工程と、

を具備することを特徴とする検出方法。

12. 前記2次抗体は標識化合物により標識化されていることを特徴とする請求項11に記載の検出方法。

13. 前記複合体と結合した2次抗体と発色剤とを直接あるいは間接的に反応させて、その発色反応に基づき前記検体中のピテロジェニン量を測定する工程を更に具備することを特徴とする請求項11又は12に記載の検出方法。

14. 試料と、標識化合物により標識化され、前記試料中に含まれるピテ

ロジェニンを認識する抗体とを反応させて複合体を得る工程と

前記複合体とビテロジェニンとを拮抗反応させる工程と

を具備することを特徴とする検出方法。

15. 前記拮抗反応により得られた反応生成物と発色剤とを反応させて、その発色反応に基づき前記検体中のビテロジェニン量を測定する工程を更に具備することを特徴とする請求項14に記載の検出方法。

16. 試料と、前記試料中に含まれるビテロジェニンを認識する抗体とを反応させる工程と、

前記試料中に含まれるビテロジェニンと前記抗体の複合体に、標識化合物により標識され、前記ビテロジェニンを認識する2次抗体とを反応させる工程と、

前記複合体と結合した2次抗体の標識と発色剤とを反応させて、該発色量を測定する工程と、

前記発色量からビテロジェニン量を算出し、該ビテロジェニン量に基づいて評価する工程と

を具備することを特徴とする評価方法。

17. 前記試料がカエルの血漿もしくは血清であることを特徴とする請求項16に記載の環境評価方法。

18. 試料と、標識化合物により標識化され、前記試料中に含まれるカエルビテロジェニンを認識する抗体とを反応させて複合体を得る工程と、

前記複合体とビテロジェニンとを拮抗反応させる工程と、

前記拮抗反応により得られた反応生成物と発色剤とを反応させて、その発色反応に基づき前記検体中のビテロジェニン量を算出し、該ビテロジェニン量に基づいて評価する工程と

を具備することを特徴とする評価方法。

19. 前記試料がカエルの血漿もしくは血清であることを特徴とする請求

項 18 に記載の評価方法。

20．哺乳動物にカエルピテロジェニンを抗原として免疫し、

前記免疫した哺乳動物から抗血清を採取し、

前記抗血清から I g G として単離することにより得られることを特徴とするカエルピテロジェニンのポリクローナル抗体。

21．哺乳動物にカエルピテロジェニンを抗原として免疫して採取した抗血清から得られる I g G をアフィニティカラムを用いて精製することにより得ることを特徴とするカエルピテロジェニン抗体の製造方法

22．前記アフィニティカラムが雄カエル血清タンパク質と結合していることを特徴とする請求項 21 に記載のカエルピテロジェニン抗体の製造方法。

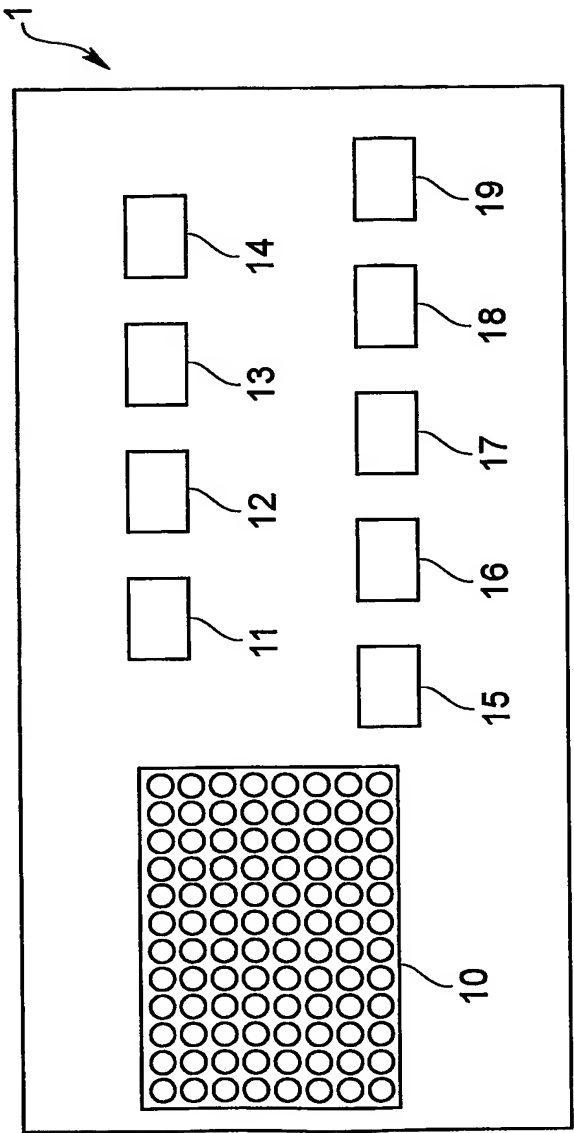
23．前記アフィニティカラムがカエルピテロジェニンと結合していることを特徴とする請求項 22 に記載のカエルピテロジェニン抗体の製造方法。

24．両生類に由来する肝細胞を培養する工程と、

前記肝細胞に対し試料を投与する工程と、

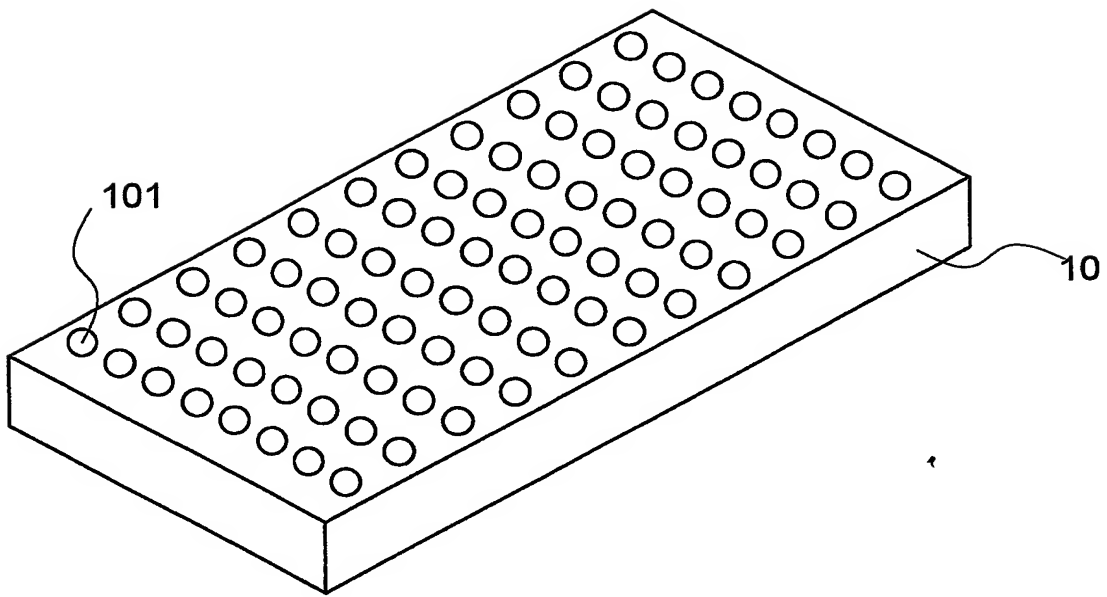
前記培養肝細胞の試料に対する応答を検出する工程と、  
を具備した評価方法。

図 1



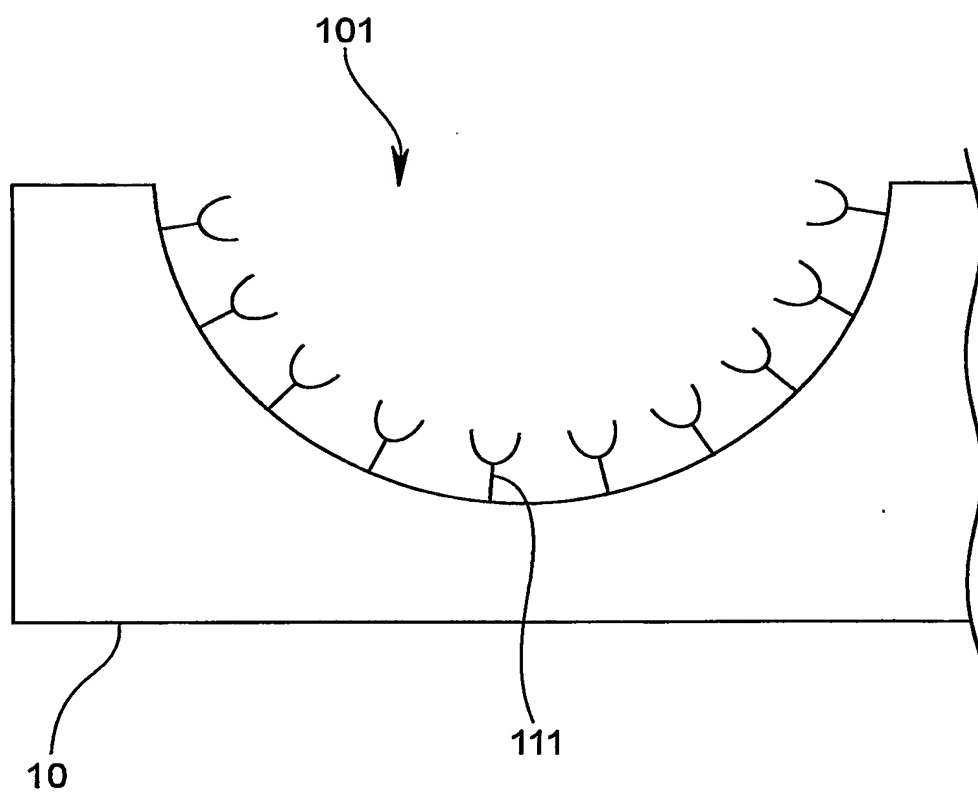
2/26

図 2



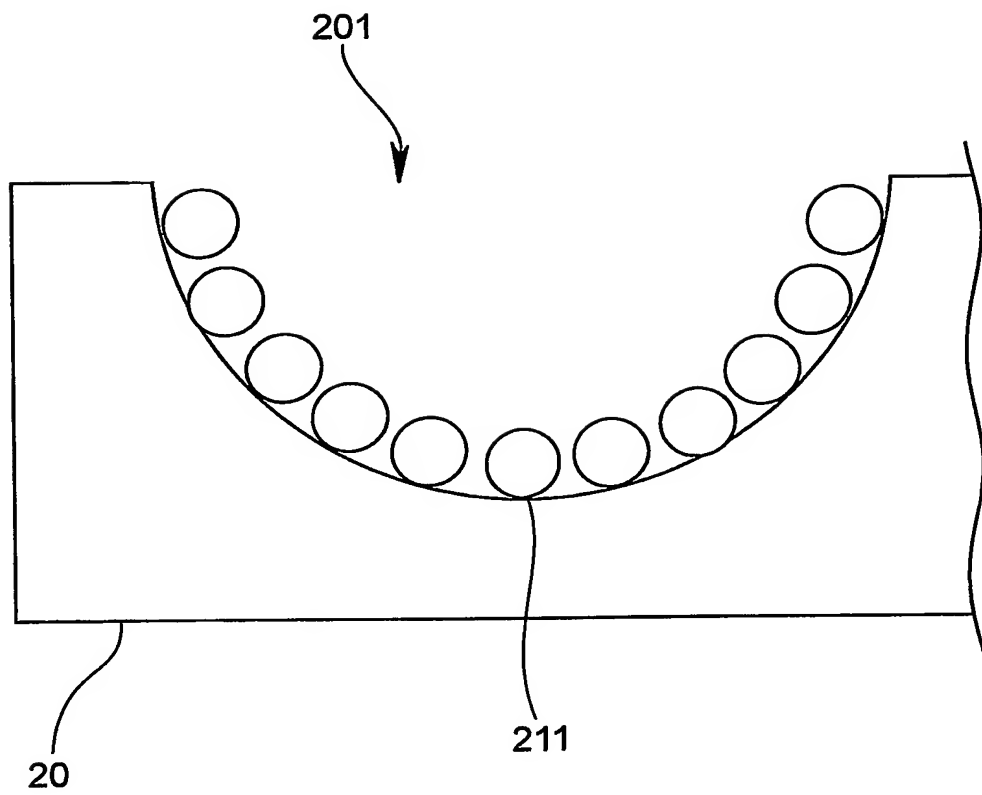
3/26

図 3



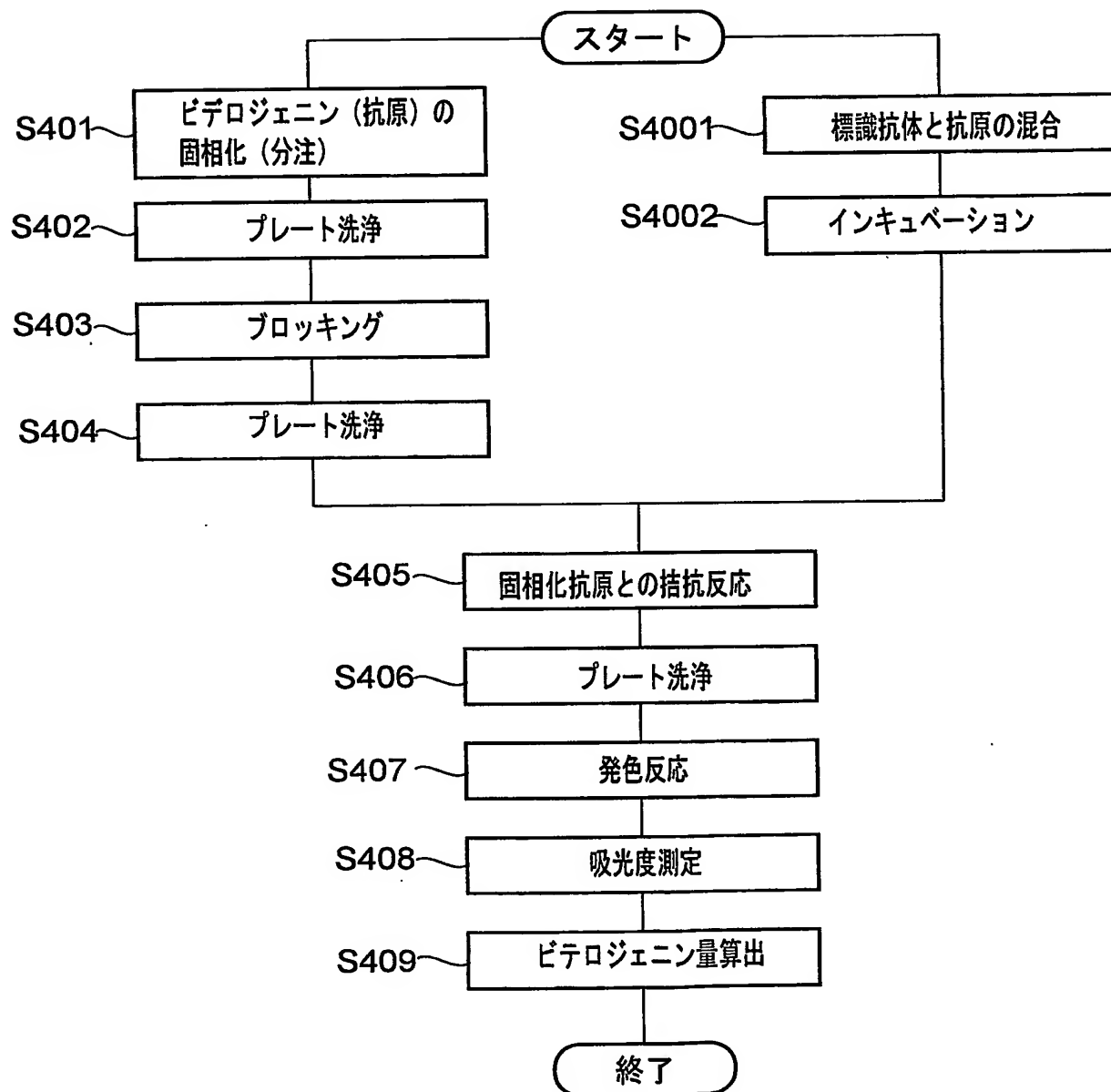
4/26

図 4



5/26

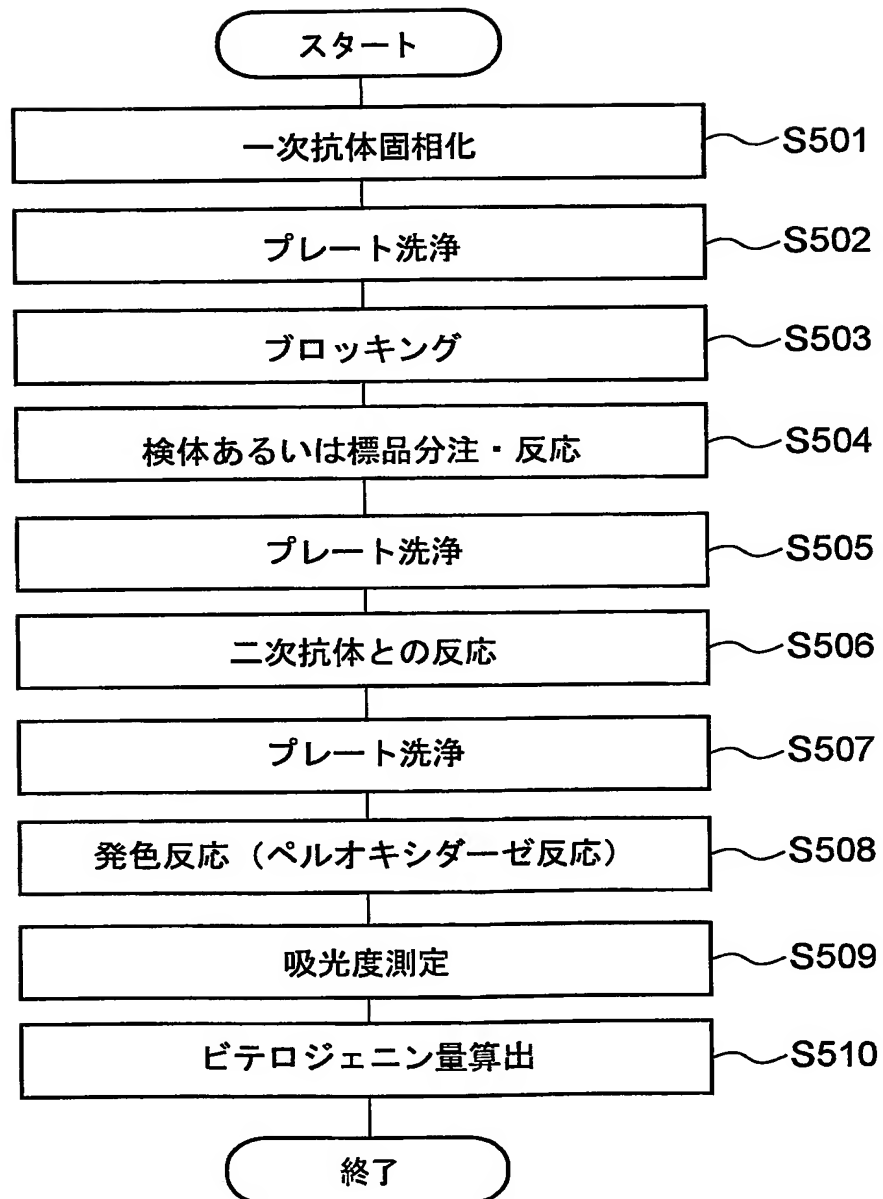
図 5





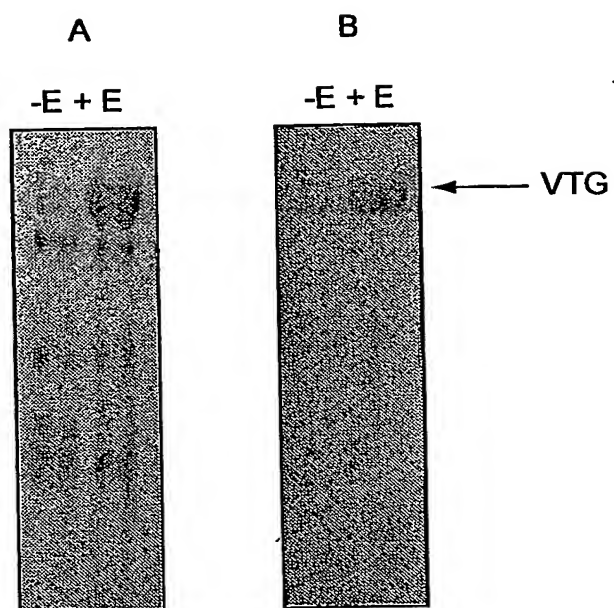
6/26

図 6



7/26

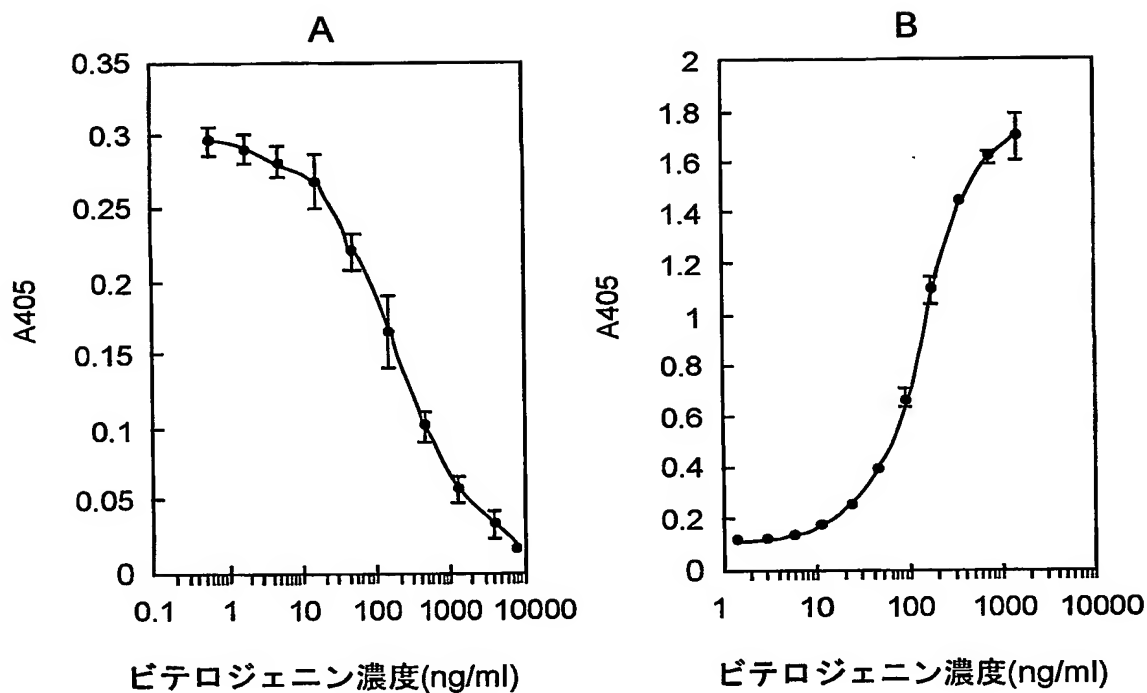
図 7



A: 精製前抗体    -E: 正常雄血清  
B: 精製後抗体    +E: E2処理雄血清

8/26

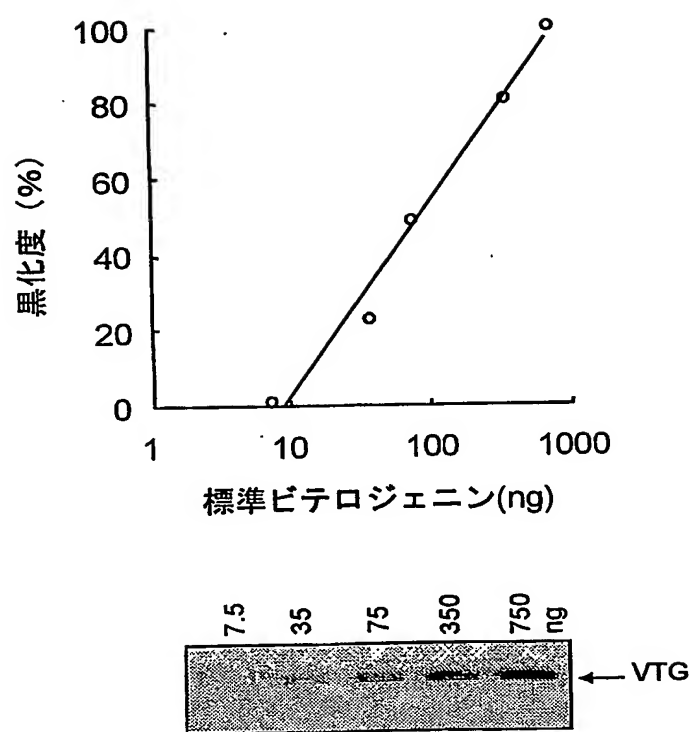
図 8



A : 拮抗法  
B : サンドイッチ法

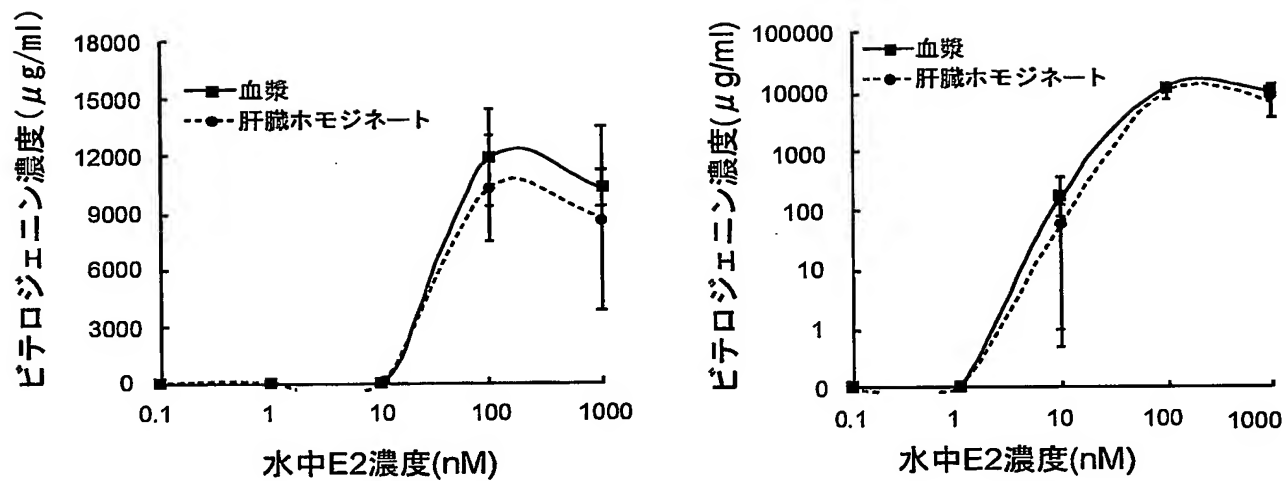
9/26

図 9



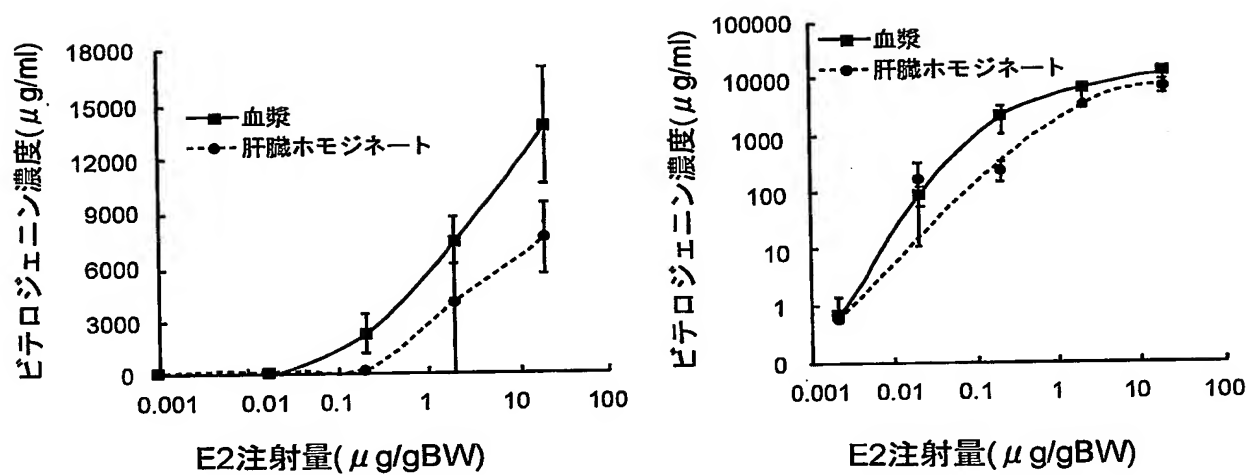
10/26

図 10



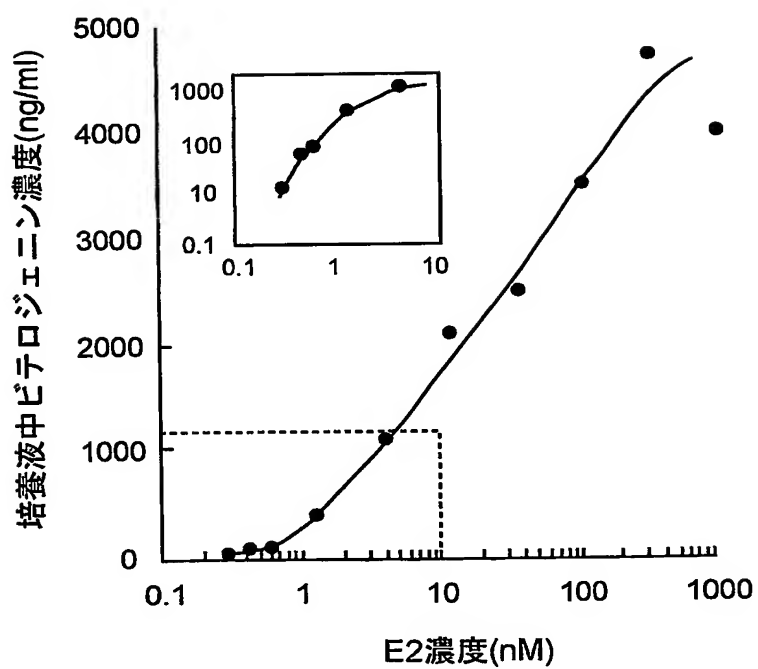
11/26

図 11



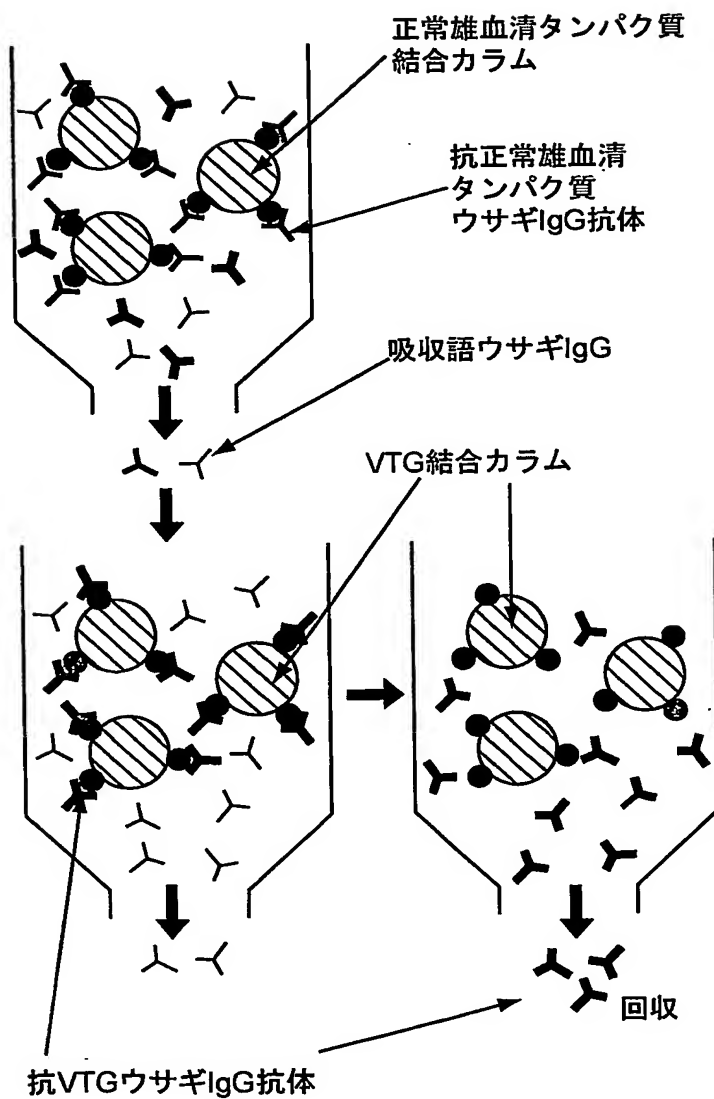
12/26

図 12



13/26

図 13





14/26

図 14

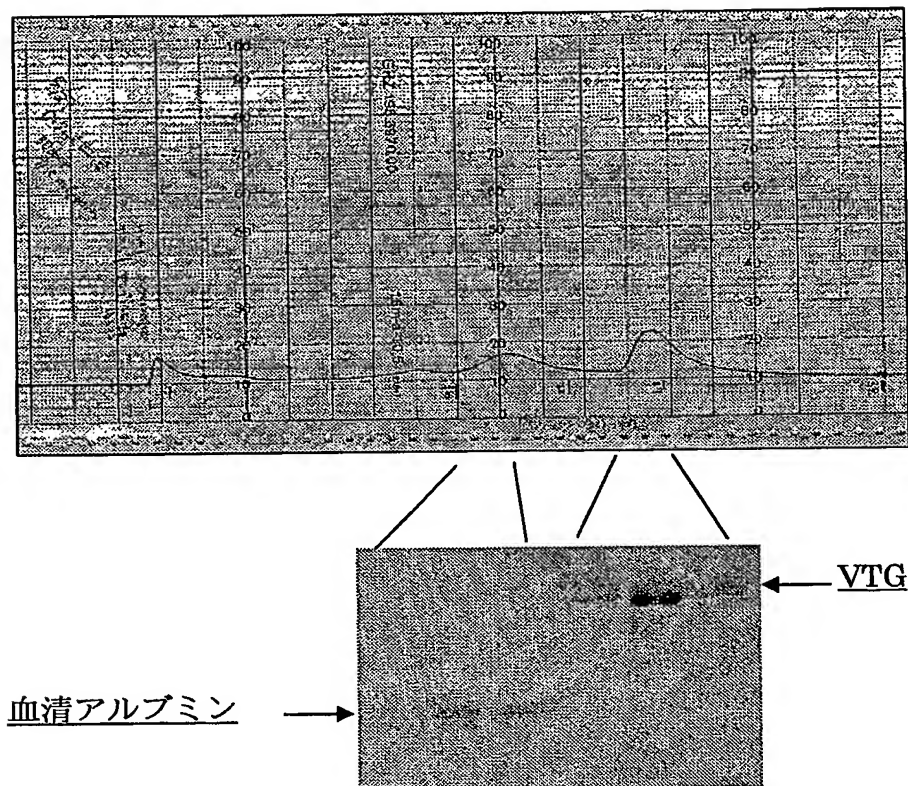


図 15

n	平均値	SD	CV(%)
8	0.803 mg/ml	0.012	1.49

15/26

図 16

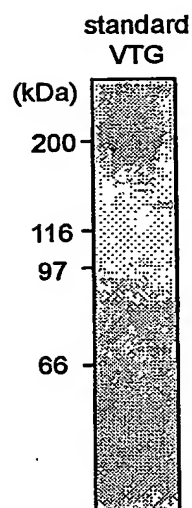
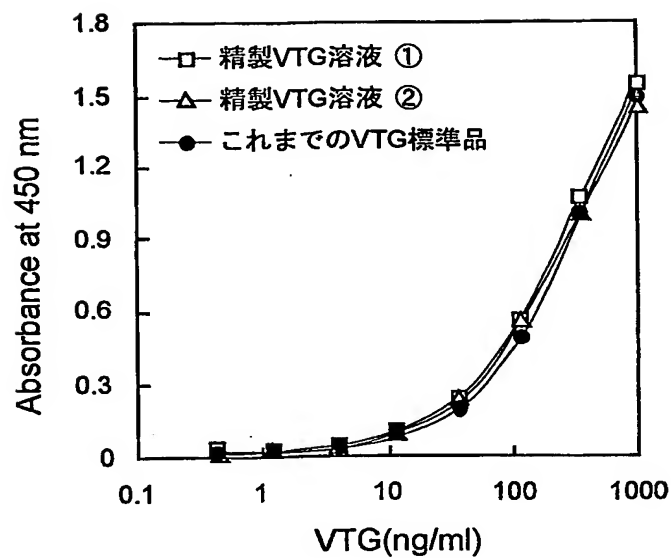


図 17



16/26

図 18

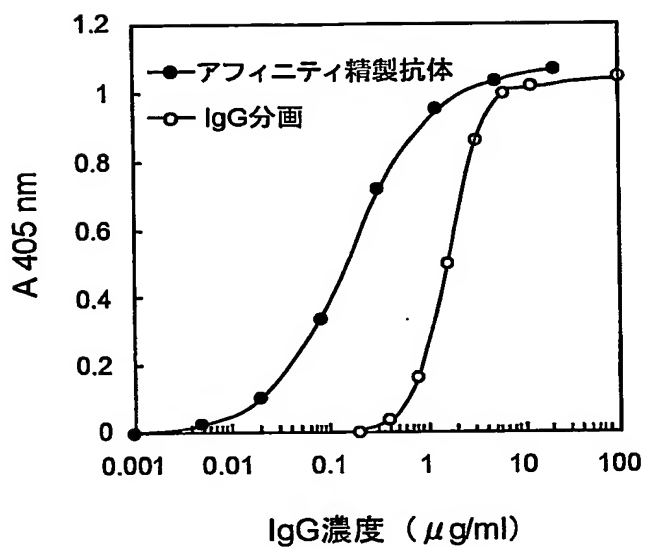
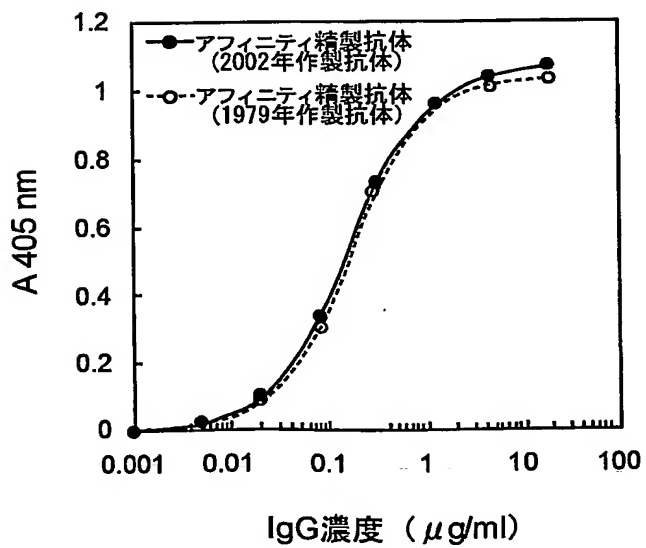
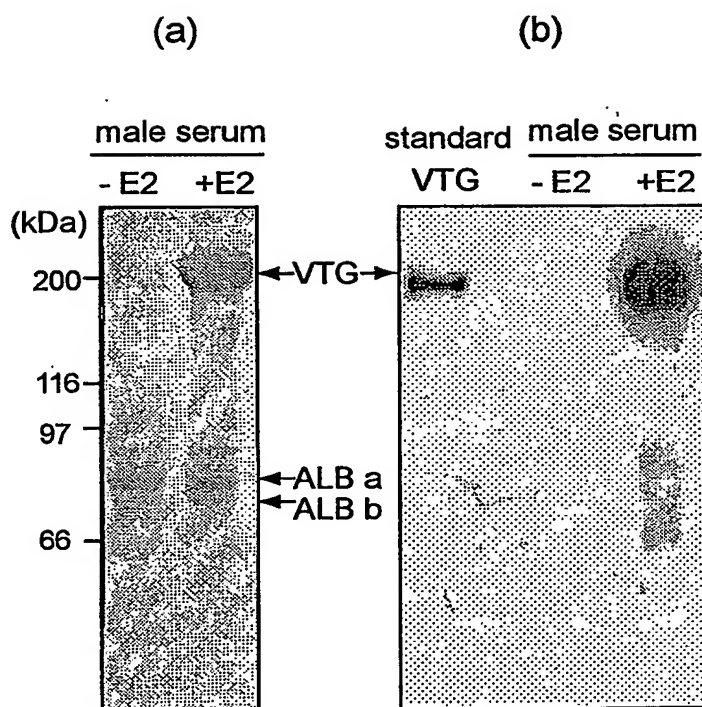


図 19



17/26

図 20



18/26

図 21

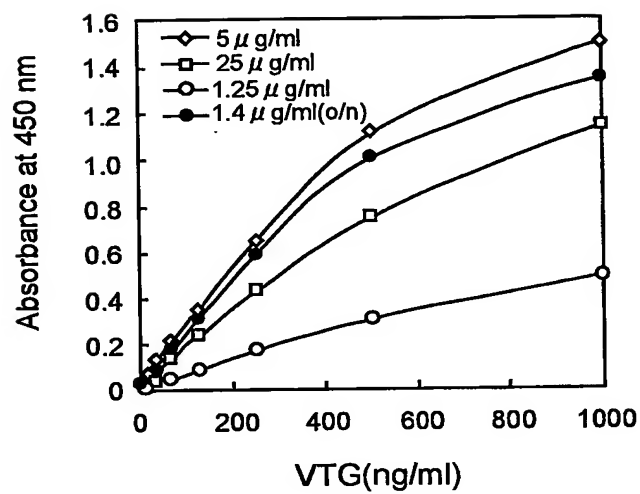
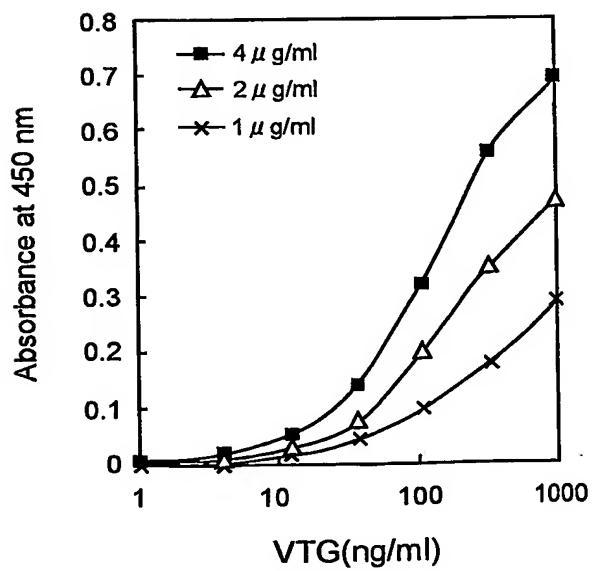
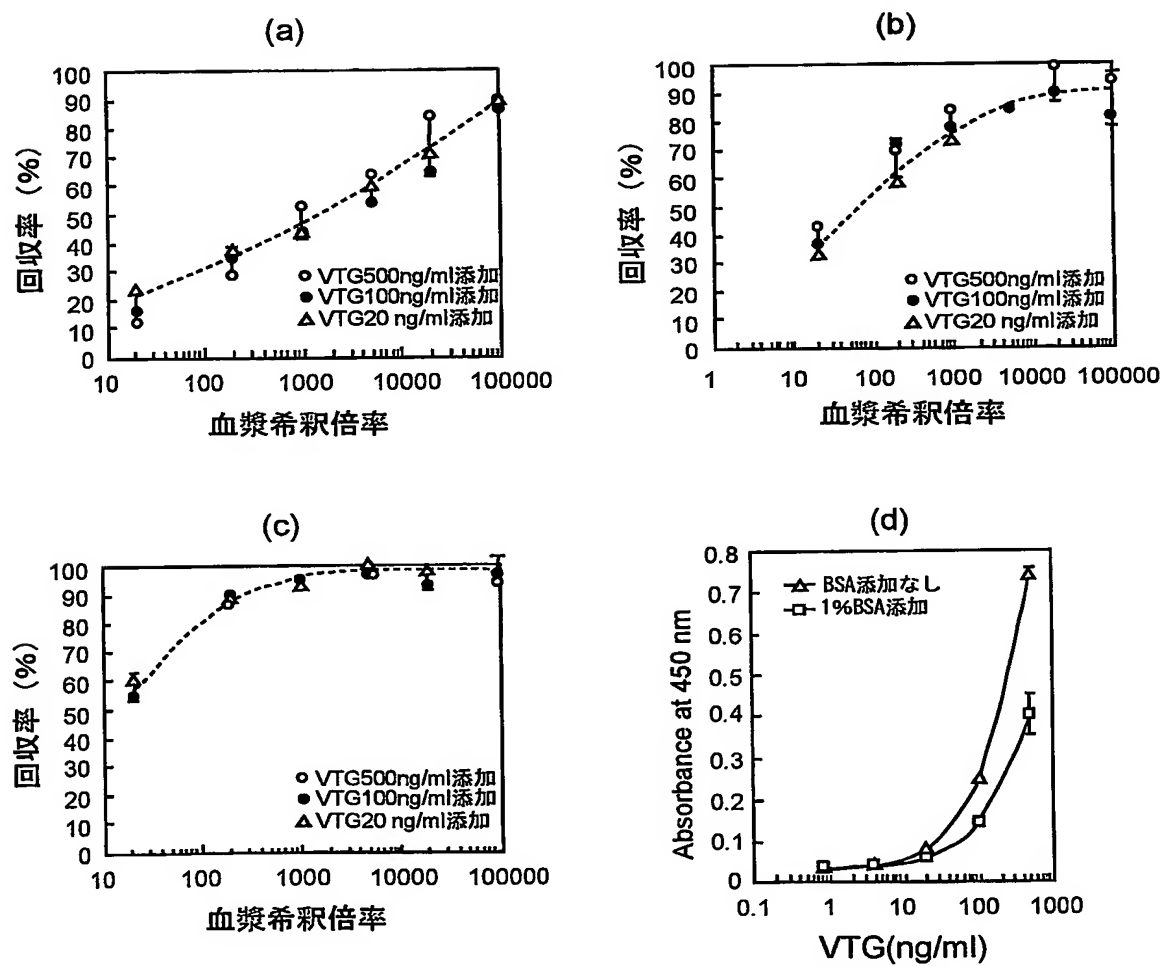


図 22



19/26

図 23



20/26

図 24

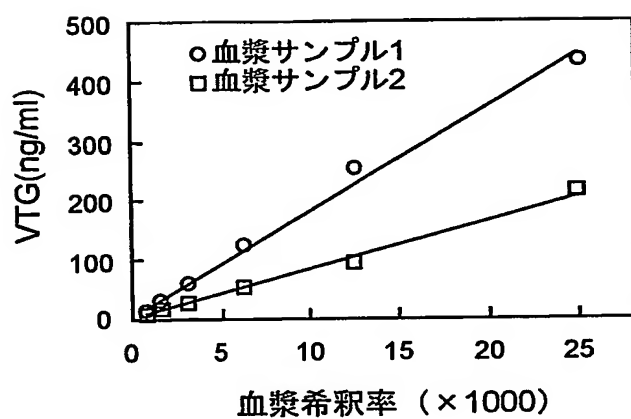
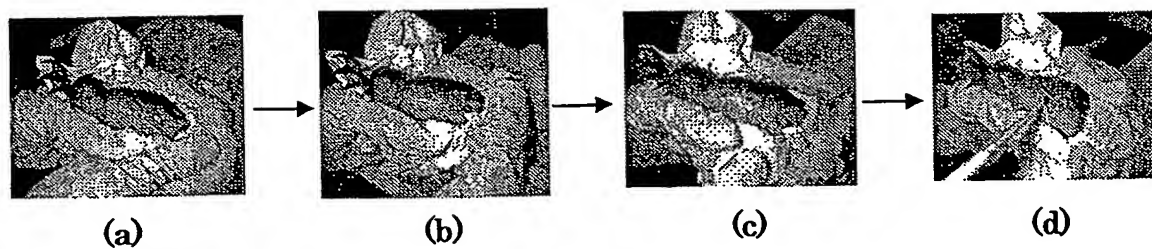


図 25



21/26

図 26

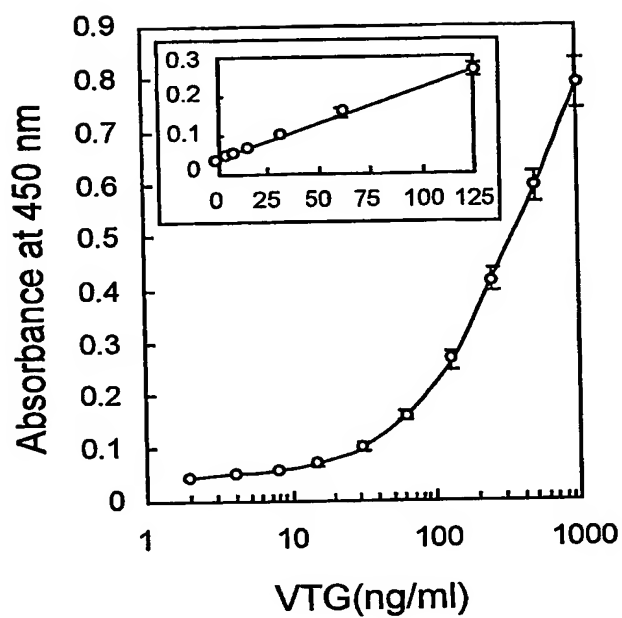


図 27

標準 VTG 濃度 (ng/ml)	0	2	4	8	15	31	62	125	250	500	1000
吸光度平 均值	0.038	0.043	0.05	0.056	0.068	0.101	0.161	0.267	0.419	0.597	0.791
SD	0.002	0.001	0.004	0.002	0.004	0.004	0.010	0.017	0.023	0.028	0.047
CV (%)	3.98	2.33	8.72	3.57	6.09	3.96	5.93	6.27	5.4	4.77	5.96



22/26

図 28

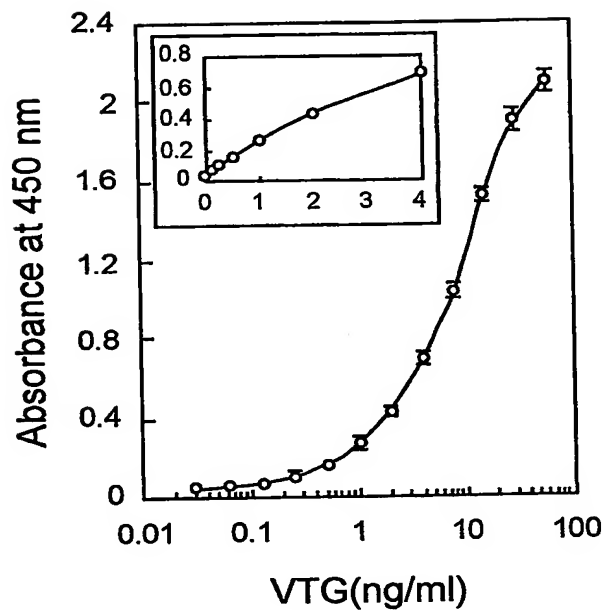
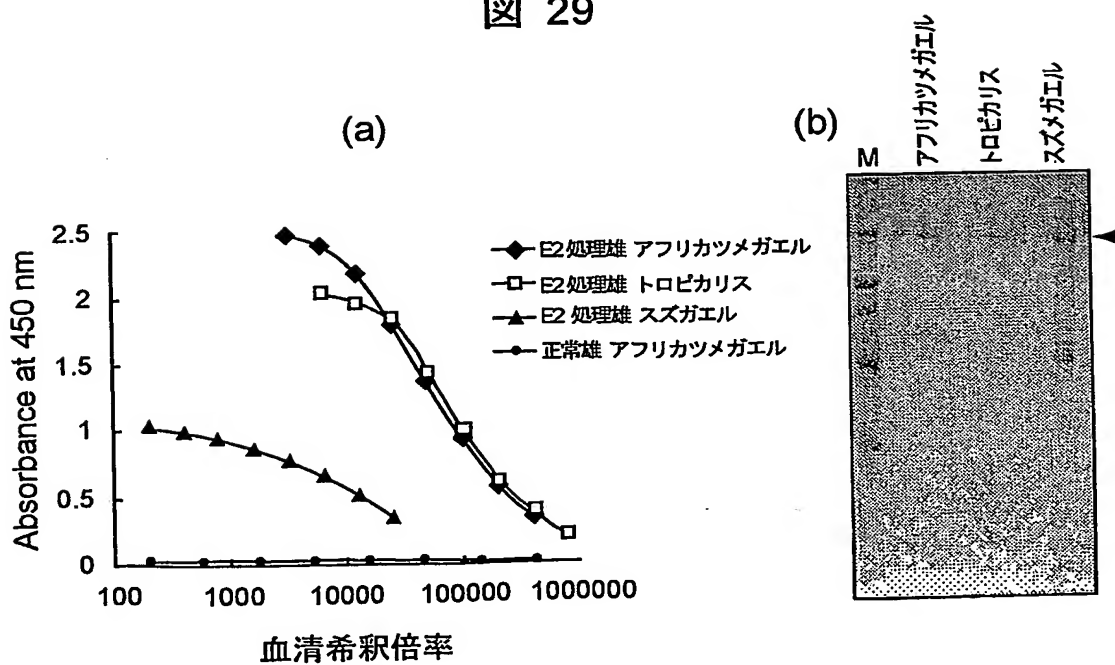


図 29



23/26

図 30

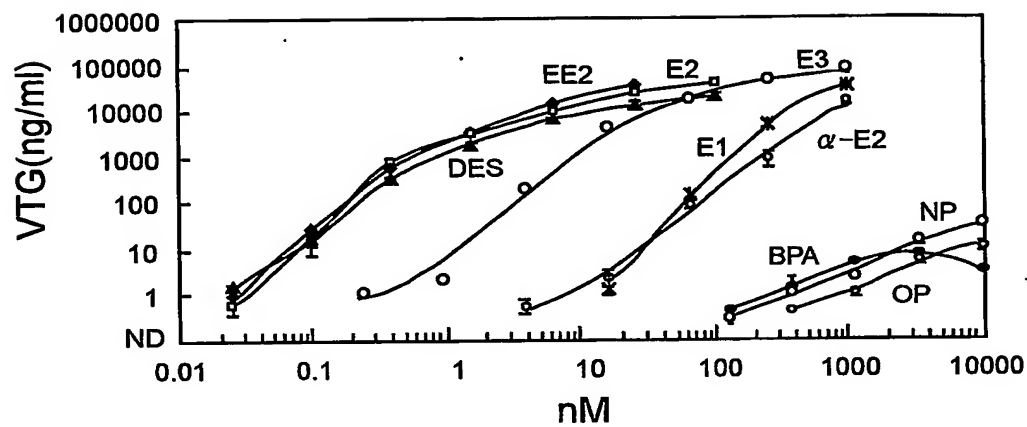


図 31

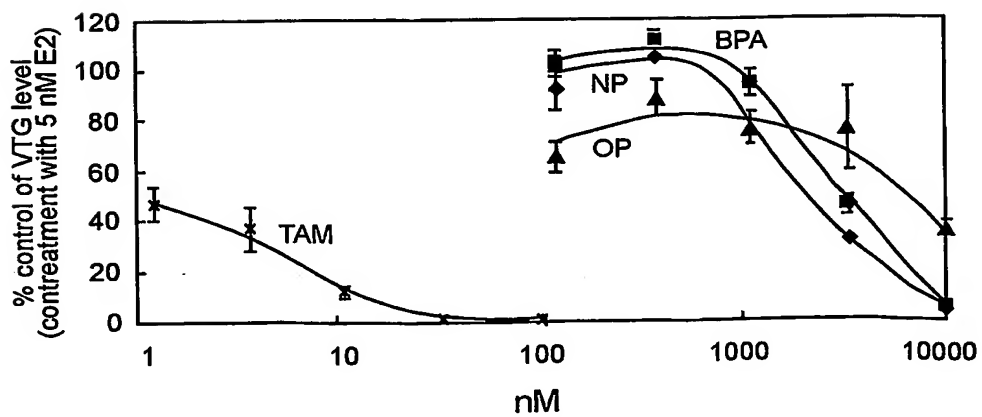


図 32

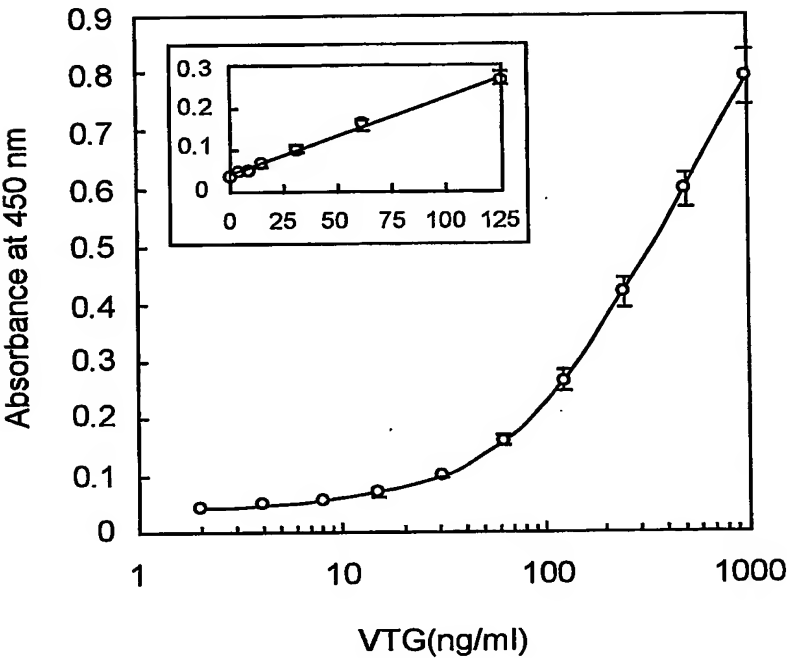
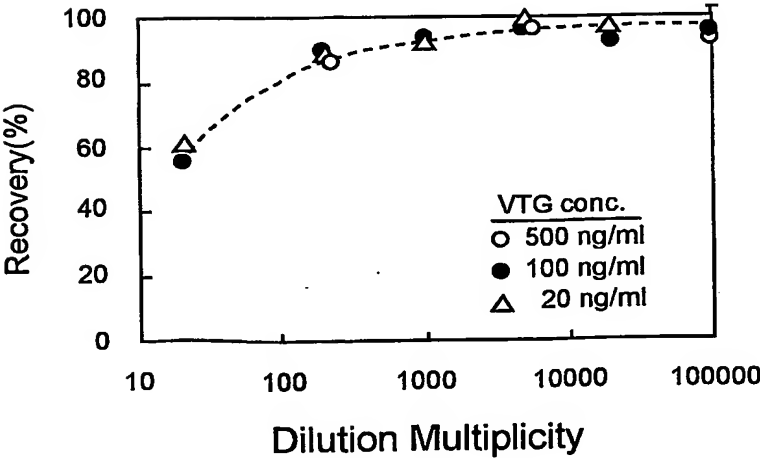


図 33



25/26

図 34

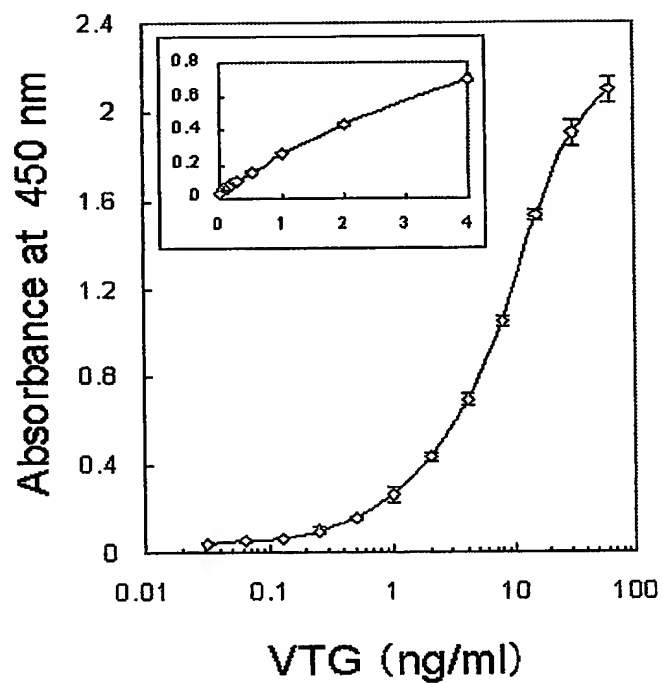


図 35

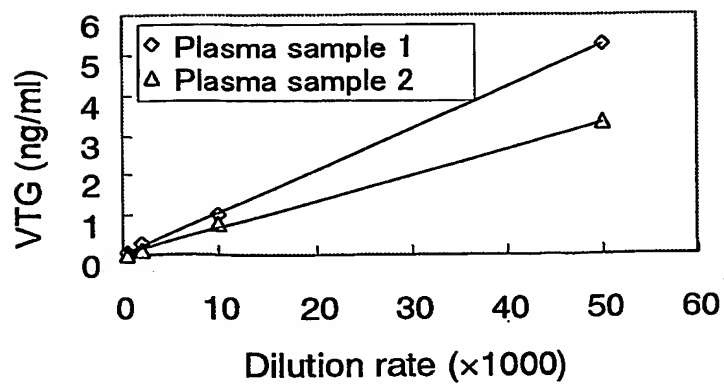
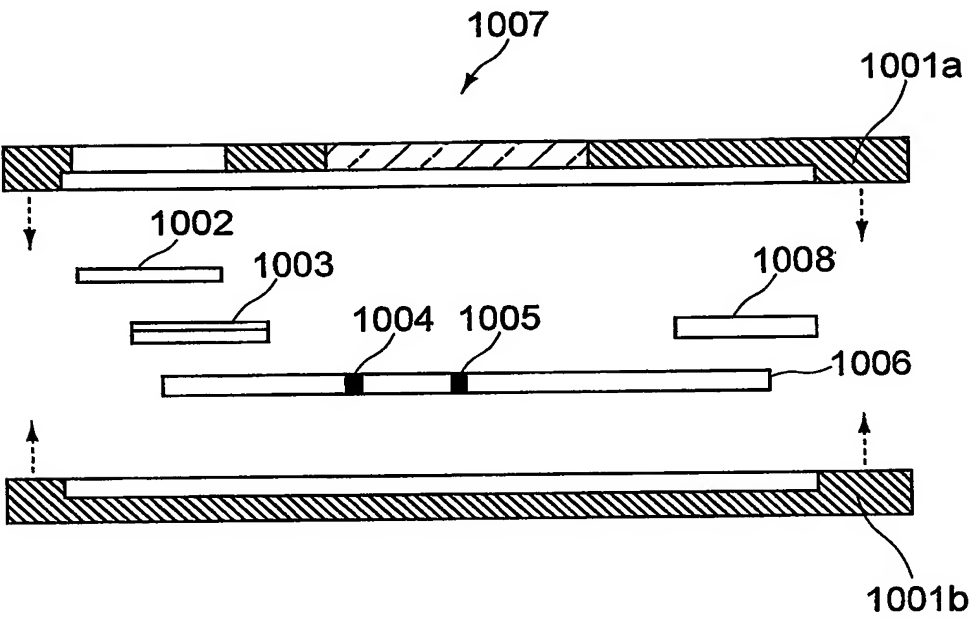


図 36



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07296

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> G01N33/53, C07K16/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> G01N33/53, C07K16/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2003	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA, REG.

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PALMER et al., "VITELLOGENIN AS A BIOMARKER FOR XENOBIOTIC ESTRTOGENS IN AN AMPHIBIAN MODEL SYSTEM", Environmental Toxicology and Chemistry, Vol.17, No.1, (1998), pages 30 to 36	1-23
X	KAWAHARA et al., "A Change of the Hepatocyte Population Is Responsible for the Progressive Increase of Vitellogenin Synthetic Capacity at and after Metamorphosis of Xenopus laevis", Developmental Biology, Vol.122, (1987), pages 139 to 145	1-24

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
09 July, 2003 (09.07.03)Date of mailing of the international search report  
22 July, 2003 (22.07.03)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07296

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claims 1 to 23 relate to inventions with the use of frog vitellogenin, while claim 24 relates to an evaluation method irrelevant to frog vitellogenin.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G01N33/53, C07K16/18

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G01N33/53, C07K16/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2003年
日本国登録実用新案公報	1994-2003年
日本国実用新案登録公報	1996-2003年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA, REG

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	PALMER et al, "VITELLOGENIN AS A BIOMARKER FOR XENOBIOTIC ESTROGENS IN AN AMPHIBIAN MODEL SYSTEM" Environmental Toxicology and Chemistry, Vol.17, No.1 (1998) p30-36	1-23
X	KAWAHARA et al, "A Change of the Hepatocyte Population Is Responsible for the Progressive Increase of Vitellogenin Synthetic Capacity at and after Metamorphosis of Xenopus laevis" Developmental Biology, Vol.122 (1987) p139-145	1-24

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09.07.03

国際調査報告の発送日

22.07.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

加々美 一恵

2J

9408

電話番号 03-3581-1101 内線 3251



## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-23は、カエルピテロジェニンを用いた発明であるのに対し、請求の範囲24は、カエルピテロジェニンとは無関係な評価方法である。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。